
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA DIGESTION CHEZ LES AMIBES ET SUR LEUR DIASTASE INTRACELLULAIRE

PAR HENRI MOUTON

I INTRODUCTION

Les diastases extracellulaires sécrétées par les organismes inférieurs qui, comme les bactéries, se nourrissent par osmose sont aujourd'hui bien connues. Les propriétés diastasiques des liquides digestifs des animaux supérieurs, ont été aussi bien étudiées malgré que des travaux récents aient montré, dans le mécanisme de leur action, une complexité jusqu'ici insoupçonnée.

Au contraire, l'action des diastases intracellulaires, qui à l'intérieur des cellules dissolvent des éléments figurés englobés dans des *vacuoles digestives*, n'est le plus souvent connue que par des études microscopiques faites *in vivo*. Ces diastases jouent pourtant dans la nature un rôle important. La digestion intracellulaire a depuis longtemps été signalée chez les Protozoaires (amibes, infusoires ciliés, etc.), chez les Myxomycètes.

On sait aussi, surtout depuis la remarquable série de travaux de Metchnikoff ¹, que la digestion est effectuée exclusivement à l'intérieur des cellules endodermiques chez la majorité des Coelentérés et des Plathelminthes. Un travail récent de Mesnil ² a levé tous les doutes à cet égard en ce qui concerne

1. METCHNIKOFF, *Zool. Anzeiger* (1878), t. I; (1880), t. III; (1882), t. V.

2. MESNIL, *Ann. Inst. Pasteur* (1901), t. X.

les Actinies, et c'est là un résultat bien fait pour surprendre si l'on songe au volume considérable des proies vivantes que ces animaux sont capables de digérer.

Enfin, chez les animaux plus élevés en organisation, de nombreuses cellules de l'organisme, dites à cause de cela phagocytes, ont conservé la propriété de digérer intracellulairement, soit les corps étrangers qui s'introduisent dans l'organisme, soit même les éléments de l'animal qui ne présentent plus une résistance suffisante. On leur doit ainsi la défense active de l'organisme contre les microbes et la disparition des tissus vieillis dans ces transformations profondes qu'un grand nombre d'animaux subissent à certaines périodes de leur développement et auxquelles on réserve aujourd'hui le nom de métamorphoses.

C'est encore à Metchnikoff que l'on doit ces notions que, aidé de ses élèves, il a appuyées d'observations nombreuses.

Si le phénomène de digestion intracellulaire est très répandu dans le règne animal, nulle part il n'est aussi facilement observable que chez les Protistes, et des observations nombreuses ont été faites sur la nature des matières qu'ils sont capables de dissoudre et sur les conditions de cette digestion.

Des recherches de nombreux auteurs au nombre desquels il faut citer Meissner, Greenwood, Le Dantec¹, Rhumbler, etc., il résulte que ce sont surtout des matières protoplasmiques empruntées à des êtres vivants (algues ou bactéries) que les amibes dissolvent dans leurs vacuoles digestives.

Des résultats analogues ont pu être obtenus chez les infusoires ciliés où plusieurs observateurs ont vu cependant quelques variétés d'amidon (amidon de pomme de terre) légèrement attaquées dans les vacuoles digestives². Les Métazoaires qui font de la digestion intracellulaire leur mode normal de digestion, dissolvent surtout des matières albuminoïdes.

Il existe donc dans les vacuoles digestives des cellules une diastase protéolytique dont l'existence a été mise en évidence, pour la première fois chez les Myxomycètes, par les travaux de De Bary et de Krukenberg. Or, on connaît diverses protéases différant entre elles par les conditions de leur activité et par les

1. LE DANTEC, *Thèse de la Faculté des Sciences*. Paris (1891), et *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. IV et V.

2. MEISSNER, *Zeitsch. f. wiss. Zool.* (1888). — FABRE-DOMERGUE, *Ann. Sc. nat. Zool.*, t. V, 7^e sér. (1888).

produits qu'elles donnent aux dépens de la matière transformée : la pepsine de l'estomac des mammifères, par exemple, digère en milieu nettement acide ; elle donne aux dépens des matières albuminoïdes des peptones ; la trypsine, versée par le pancréas dans l'intestin des mêmes animaux, agit en milieu neutre ou faiblement alcalin et donne, en même temps que des peptones, des corps de composition plus simple parmi lesquels on rencontre toujours la leucine et la tyrosine. Ces deux diastases protéolytiques forment ainsi deux types différents dont se rapprochent un grand nombre d'autres diastases extraites d'animaux ou de plantes.

On a tenté depuis longtemps de connaître les conditions d'activité des protéases intracellulaires, en faisant absorber aux animaux des réactifs colorants dont la teinte soit apparente au microscope et soit capable de changer suivant la réaction acide ou alcaline du milieu. Il est seulement bien entendu que l'on doit choisir des substances non toxiques.

Chez une amibe et chez plusieurs espèces d'infusoires ciliés, Engelmann put ainsi constater que les grains de tournesol ingérés devenaient rouges, mais il attribua la réaction acide au protoplasme. Metchnikoff rectifia cette erreur en montrant que le protoplasme était en réalité alcalin et les vacuoles seules acides chez deux infusoires ciliés : *Vorticella* et *Stylonychia*. Il essaya en vain, ainsi que d'autres auteurs, d'obtenir le même virage du tournesol chez certaines autres espèces d'infusoires ciliés et chez les amœbiens. Le liquide dans lequel vivent tous ces animaux est d'ordinaire assez alcalin au tournesol. En le sensibilisant par une addition ménagée d'acide, ce que peu d'espèces supportent, Le Dantec a pu montrer, avec le même réactif, la sécrétion d'acide dans les vacuoles digestives du *Stentor*, de la *Paramécie*, etc... Il a démontré fort élégamment que les grains rouges que l'on trouve au bout d'un certain temps dans les vacuoles digestives des animaux sont bien des grains de tournesol, en écrasant les infusoires sous le microscope¹. On voit alors brusquement les grains rouges reprendre leur teinte bleue primitive. Le même changement subit de couleur peut s'observer lorsqu'une vacuole se trouve rejetée par l'animal.

¹ METCHNIKOFF (*Ann. Inst. Pasteur*) avait déjà employé ce procédé chez les Myxomycètes.

D'autres réactifs que le tournesol peuvent être employés dans le même but et j'ai eu souvent l'occasion d'observer chez *Paramæcium aurelia* le bleuissement des vacuoles digestives lorsqu'on plonge les animaux en expérience quelques instants dans une solution étendue de rouge Congo. Au bout d'un temps assez court, tous les individus contiennent de nombreuses vacuoles dont la teinte varie du rouge (réaction neutre ou alcaline) au bleu (réaction acide).

Aujourd'hui, la sécrétion d'acide dans les vacuoles digestives de toutes les cellules qui digèrent intracellulairement peut être considérée comme tout à fait établie. Mais il a fallu pour la mettre en évidence recourir souvent à des réactifs plus sensibles que le tournesol, capables de virer pour une moindre acidité. Pour les infusoires ciliés et les amibes, par exemple, Le Dantec a employé avec succès l'alizarine sulfo-conjugée qui, violette en milieu alcalin, jaune en milieu acide, passe d'une couleur à l'autre d'abord par une série continue de teintes allant du violet au rose, avant de subir le virage brusque qui l'amène au jaune. Dans le milieu généralement assez alcalin où vivent les animaux en expérience, l'alizarine est violette, et comme ce milieu contient souvent une petite quantité de sels de calcium, elle y forme de petits cristaux aciculaires violets qu'ingèrent et dissolvent les amibes ou les infusoires. Les vacuoles qui les contiennent deviennent peu à peu roses, — et même jaunes chez les ciliés, comme il est facile de s'en convaincre en répétant cette expérience sur *Paramæcium aurelia*.

Il faut noter ici que l'ingestion de grains de tournesol par les cellules endodermiques d'une planaire a été obtenue par Metchnikoff qui en présentait aux animaux mêlés à du sang : un petit nombre de grains prennent dans les cellules une teinte violet clair. Par le même procédé, on a obtenu à l'intérieur des filaments mésentériques des actinies une coloration lilas des grains absorbés. Dans tous les cas, les grains restaient franchement bleus dans le milieu extérieur.

Toutes ces observations indiquent donc toujours la sécrétion dans les vacuoles digestives d'un acide¹, souvent d'ailleurs en trop petite quantité pour amener la réaction à une acidité

1. Je me contente de rappeler ici les observations faites par Metchnikoff avec le *neutralroth* et dont il sera question plus loin.

franche au tournesol. Aussi le ferment qu'elles contiennent doit-il être plus voisin de la trypsine que de la pepsine qui digère en milieu très franchement acide. Une telle diastase a d'ailleurs été déjà extraite de plusieurs organismes.

Krukenberg¹, Frédéricq, les premiers, ont pu, à l'aide de la glycérine, obtenir de plusieurs éponges et actinies un ferment trypsique. C'est un semblable ferment que tout récemment Mesnil a extrait des filaments mésentériques des actinies broyés dans l'eau de mer. Quant aux protozoaires, on n'avait pu jusqu'ici en extraire aucune diastase.

Il faut en effet pour entreprendre ce travail disposer d'une masse considérable d'animaux. Il faut d'autre part se mettre à l'abri de l'intervention des bactéries, qui sont de très actifs producteurs de ferments. Or, les amibes, les infusoires ciliés vivent constamment dans des milieux chargés de ces bactéries dont ils font leur nourriture ordinaire. Même les espèces de ciliés qui vivent d'infusoires plus petits fréquentent forcément les mêmes milieux. J'ai vainement cherché jusqu'ici à me procurer une quantité suffisante de ciliés *sensiblement* purs de bactéries pour pouvoir tenter une extraction de leurs ferments.

J'ai donc été conduit à me proposer de cultiver purement les amibes comme on cultive purement un grand nombre d'espèces de bactéries ou de champignons. Le problème n'était pas nouveau. Il avait été abordé par divers auteurs dans des buts différents. Les uns cherchaient surtout à séparer les différentes espèces amœbiennes, à étudier leur cycle de développement et quelques points de leur physiologie. Ils n'avaient pas à se soucier de la présence des bactéries, pourvu que les diverses espèces d'amibes fussent, dans les cultures, isolées les unes des autres. D'autres auteurs avaient surtout pour but de montrer le rôle pathogène que joueraient certaines espèces dans la dysenterie, par exemple. Ceux-là devaient essayer d'obtenir des cultures strictement pures. Or, on peut affirmer aujourd'hui que, malgré la variété des milieux employés, de telles cultures n'ont été obtenues, ni avec les amibes banales, ni avec les amibes prétendues pathogènes. On doit admettre, jusqu'à nouvel ordre, la nécessité d'introduire dans les cultures d'amibes au moins une espèce

1. KRUKENBERG, Ueber die Enzyymbildung in den Geweben und Gefässen, *Untersuchungen d. phys. Inst. d. Univ. Heidelberg*, t. II.

bactérienne vivante, car une telle nourriture semble absolument indispensable à ces êtres. Dans ces conditions, on peut obtenir sans de trop grandes difficultés un développement assez abondant des amibes.

Je dirai ici quelques mots des travaux antérieurs aux miens sur la culture des Amibes. J'exposerai ensuite les caractères de l'espèce que j'ai employée et j'indiquerai le procédé de culture que j'ai suivi. Enfin je parlerai de quelques observations microscopiques que j'ai été conduit à faire sur cette espèce avant d'aborder l'étude de la diastase que j'en ai extraite.

II

TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LA CULTURE DES AMIBES

On trouve des amibes à l'état naturel dans l'eau, surtout dans celle qui, contenant des débris organiques en décomposition, est riche en bactéries, dans la terre humide, et aussi sur diverses matières en fermentation ou en putréfaction. Je ne parlerai pas des espèces qui ont été rencontrées dans le tube digestif ou dans ses annexes chez l'homme ou chez les animaux sains ou malades.

On se procure aisément des amibes en abandonnant à elles-mêmes des macérations de foin ou de paille dans l'eau. De nombreux milieux liquides permettent de les cultiver. Il paraît seulement important d'éviter un trop luxuriant développement des microbes qui les accompagnent ¹. L'emploi de milieux peu nutritifs, l'addition ménagée d'alcali ou d'antiseptiques permettent d'atteindre ce but. Il est aussi facile de cultiver les amibes sur des milieux solides transparents, à base de gélatine ou de gélose, qui rendent facile la séparation des diverses espèces et l'étude de leur cycle de développement. Celli et Fiocca ² les premiers ont usé dans ce but d'une gelée

1. Il y a certainement une lutte active entre les amibes et les proies qu'elles ingèrent. Metchnikoff a développé cette idée dans son livre *Sur l'Immunité* (Paris, 1901). Voir aussi *Centralbl. f. Bakt.* (1902), 2^e partie, p. 431, les récentes observations de Chrzaszcz sur une myxamibe qui se nourrit de levures. Dans la culture, quand l'un des deux organismes devient florissant, l'autre est étouffé.

2. CELLI ET FIOCCA, *Centralbl. Bakt.*, t. XV (1894), p. 470, et t. XVI (1894), p. 329. *La Riforma medica* (1894), n° 187.

de *Fucus (Chondrus) crispus*, gelée transparente et, à ce que j'ai expérimenté, plus molle que la gélouse. Cette gelée est ou non additionnée d'une petite quantité de bouillon et fortement alcalinisée. Les mêmes auteurs firent d'ailleurs des efforts infructueux pour séparer leurs amibes des diverses espèces bactériennes qui les accompagnaient.

Dans un travail plus récent, Beyerinck¹ a pu cultiver sur milieu solide deux espèces d'amibes dans des conditions différentes, mais dignes pour toutes deux d'être rapportées.

La première a été obtenue en même temps que le ferment nitrique et diverses autres espèces bactériennes sur une gélouse épuisée par des lavages répétés et additionnée de quelques sels. Elle se multiplie sur les colonies de bactéries et s'en nourrit. L'auteur l'appelle *A. nitrophila*.

Dans une autre recherche, exposée par l'auteur dans le même travail que la précédente, une amibe a été isolée en présence d'une seule espèce microbienne. Cette espèce, que Beyerinck a nommée *A. zymophila*, parce qu'il l'a rencontrée en association avec des levures, a été isolée de raisins attaqués par des guêpes et en voie de fermentation spontanée.

Dans une culture sur extrait de malt gélatiné appaurent, avec une levure apiculée et un ferment acétique, des amibes que l'auteur parvint, par des isolements, à obtenir en présence de la levure seule ou du ferment acétique seul. Ces cultures purent être propagées sur l'extrait de malt gélatiné ou même sur le bouillon gélatiné. Elles paraissent pouvoir être indéfiniment conservées par repiquage à la façon des cultures bactériennes.

Que l'organisme qui les accompagne soit la levure ou la bactérie, les amibes forment des amas sur les colonies dont elles se nourrissent. L'auteur du mémoire fait au sujet de ces cultures une remarque fort curieuse : tandis que ni la levure ni le ferment ne liquéfient la gelatine, la liquéfaction se produit très rapidement en présence des amibes et ce phénomène est plus sensible dans les cultures avec la levure que dans celles qui contiennent le ferment, ce que Beyerinck attribue à la sécrétion par l'amibe d'une diastase protéolytique liquéfiant la

1. BEYERINCK, *Centralbl. Bakt.* 1^{re} partie, t. XIX (1896), p. 257, et t. XXI (1897), p. 401.

gélatine et plus active en milieu alcalin qu'en milieu acide, et, par ce caractère, semblable à la trypsine. Il est assez singulier que cette diastase ne peut être attribuée au liquide rejeté par la vacuole pulsatile, l'espèce considérée n'en possédant pas : elle sortirait donc de l'amibe soit par osmose, soit lorsque se vident au dehors les vacuoles contenant les résidus de la digestion.

On pouvait penser que, comme c'est le cas pour les bactéries, cette diastase pouvait préparer à l'amibe des aliments absorbables par osmose. Cependant, des substances diffusibles que l'auteur a essayé de lui offrir, aucune n'a pu lui permettre de se multiplier sans bactéries, et c'est toujours sur les points de la culture où se remarquent les colonies microbiennes que l'amibe forme des amas abondants. La protéase qu'elle excrète paraît donc être un simple produit de rejet, inutile à l'animal. Mais si elle provient des vacuoles digestives, comme il est permis de le supposer avec Beyerinck, elle a eu un rôle utile et du même coup nous donne une indication sur la nature des diastases digestives intracellulaires.

J'ai cité amplement ce travail parce qu'il est très précis et nous fournit, outre cette dernière remarque intéressante, un exemple de ce que j'appellerai désormais une *culture pure mixte* dans laquelle nous voyons associée à l'amibe une seule espèce microbienne dont elle fait sa nourriture et au choix de laquelle elle se montre dans une certaine mesure indifférente.

Je ne citerai pas un certain nombre de travaux peu importants, mais je ne puis ne pas dire quelques mots des travaux d'auteurs qui ont obtenu d'autres cultures pures mixtes, mais n'ont malgré tous leurs efforts pu réussir à faire *développer* les amibes en culture pure, bien qu'ils aient pu les *isoler* de toute espèce bactérienne.

L'isolement des amibes a été obtenu par Frosch¹ de la manière suivante : après un certain temps de culture en milieu liquide ou solide, les conditions finissent toujours par devenir peu favorables pour les amibes, et elles s'enkystent, devenant ainsi plus résistantes aux agents physiques (chaleur, dessiccation) ou chimiques que sous leur forme mobile.

Ayant donc cultivé en présence de bactéries une seule espèce amœbienne extraite de la terre de jardin et ayant obtenu par

1. Frosch, *Centralbl f. Bakt.* 1^{re} partie, t. XXI (1897), p. 926.

des séparations répétées qu'elle ne fût accompagnée que d'espèces bactériennes asporogènes, Frosch chercha un moyen de détruire les bactéries, mais non les kystes. Il eut recours pour cela à une solution très concentrée de soude caustique (à 20 %) qu'il fit agir sur la culture pendant 3 jours à la température du laboratoire. Au bout de ce temps, on put s'assurer que les bactéries étaient mortes et que les kystes vivaient. Ils étaient en effet capables de donner une culture lorsqu'on les ensemençait sur une gélose contenant des colonies d'une épaisse et courte bactérie asporogène immobile et arrondie aux bouts, que l'auteur avait isolée. Au contraire, ni les milieux solides et liquides, ni les milieux modifiés par la bactérie, ni même les corps des mêmes bactéries tuées ne permettaient le développement des kystes.

Il paraît toutefois possible dans certaines conditions de nourrir les amibes de corps bactériens tués par la chaleur, puisque Tsujitani¹ a décrit dans une note assez courte comment il y était parvenu. Cet auteur cultive d'abord en présence de bactéries une seule espèce amœbienne. Aux bactéries qui l'accompagnent naturellement, il substitue peu à peu le vibrion cholérique. Il reste à faire disparaître ce microbe asporogène. Tsujitani imbibe d'une culture vieillie, contenant des kystes, des fils de soie stériles et les laisse se dessécher dans un exsiccateur à acide sulfurique dans des conditions de stérilité parfaites. Au bout d'un temps convenable, onensemence des fragments des fils desséchés. Les vibrions sont morts, les kystes restent susceptibles de régénération : il suffit de les ensemençer sur un milieu contenant des bactéries vivantes pour obtenir une culture d'amibes. Au contraire, tout développement est impossible sur tous les milieux stériles essayés. Jusqu'ici, point de résultat nouveau et la dessiccation permet seulement d'obtenir le même effet que l'on avait précédemment obtenu par l'action des alcalis. Mais en tuant des bactéries à une température peu élevée et les offrant en nourriture aux amibes, Tsujitani a pu obtenir des cultures, à vrai dire médiocres. Toutefois une espèce bactérienne particulière, que l'auteur a isolée d'une infusion de foin et dont il décrit les caractères, réussit, tuée par un chauffage de trois quarts d'heure à 60°, à permettre le développement d'aussi bonnes cultures d'amibes que les bactéries vivantes.

1. TSUJITANI, *Centralbl. f. Bakt.* 1^{re} partie, t. XXIV (1898), p. 666.

Récemment, les expériences de Frosch ont été reprises par Zaubitzer¹ sur une amibe isolée d'une infusion de paille. Il a employé la même méthode de séparation par les alcalis concentrés et n'a pu que confirmer les conclusions des autres auteurs relativement à la nécessité de donner aux amibes une proie vivante, puisque tous les autres aliments qu'il a pu leur offrir, même les microbes tués par la chaleur, ont été impuissants à assurer le développement de la culture.

J'ai cru devoir donner cet historique un peu complet de la question de la culture des amibes qui allégera d'autant l'exposition de mes propres recherches sur ce sujet². J'arrive maintenant à la description de l'espèce d'amibe qui a servi dans ce travail et à l'exposé des méthodes de culture que j'ai employées.

III

DESCRIPTION DE L'AMIBE

De nombreuses espèces d'amibes ont été nommées depuis cinquante ans par divers auteurs. Un certain nombre manquent de description précise et d'autres font certainement double emploi, tandis que beaucoup sont trop compréhensives. Suivant les conditions dans lesquelles on la place, suivant même la nourriture qu'elle englobe, l'aspect d'une amibe peut varier beaucoup. Il faudrait certainement, pour un grand nombre d'espèces, faire ce que Celli et Fiocca ont fait pour certaines d'entre elles, ce que Beyerinck a fait pour *A. nitrophila* et *A. zymophila*: étudier le cycle complet du développement pour avoir des diagnoses précises. Je donne ici les caractères de l'amibe que j'ai employée.

FORME MOBILE. — Elle comprend un ectoplasme parfaitement hyalin, un endoplasme granuleux rempli de vacuoles digestives dont le nombre est parfois très considérable. A l'intérieur, est un noyau formé d'un gros karyosome réfringent entouré d'une auréole claire, le tout bien visible sur le vivant

1. ZAUBITZER, *Arch. f. Hygiene*, t. XXIV (1904), p. 403.

2. Pour des détails plus complets, consulter R. BEHLA, *Die Amöben* (Hirschwald éd.), Berlin (1898).

(fig. 6). Les dimensions de l'amibe sont assez variables. On peut donner comme diamètre moyen $20\ \mu$. Cette mesure est prise au moment où l'animal est sensiblement sphérique, comme il arrive lorsqu'on vient de l'agiter un peu en délayant une petite quantité de culture dans une goutte d'eau pour faire une préparation microscopique. Si l'on abandonne ensuite cette préparation à elle-même pendant quelque temps, et que l'amibe, s'accoutumant à ce nouveau milieu, étale ses pseudopodes à la surface du porte objet, son diamètre devient plus considérable. Je reviendrai sur ces variations de diamètre dues à l'aplatissement à propos de l'aspect des cultures. Lorsque l'amibe, dans une préparation, chemine en étalant ses pseudopodes, on voit à l'avant dans le sens de la marche une zone très étendue d'ectoplasme hyalin. Cet ectoplasme est au contraire peu étendu à l'arrière.

Cette amibe n'a pas de mouvements brusqués, mais semble couler d'une manière continue, à la surface du support. Les pseudopodes qui ne sont pas très aigus se forment et se rétractent avec une lenteur uniforme. La vacuole pulsatile, qui bat environ toutes les minutes à la température du laboratoire, se trouve à l'arrière. Elle m'a toujours paru unique et jamais je ne l'ai vue accompagnée de vacuoles secondaires.

KYSTES. — Les kystes, à peu près sphériques, ont un diamètre assez constamment compris entre 15 et $20\ \mu$. Leur enveloppe épaisse montre un double contour : l'extérieur est généralement polygonal, l'intérieur arrondi. Le protoplasme contenu dans ces kystes est uniformément granuleux, sans aucune vacuole quand il est au repos. Mais la vacuole digestive apparaît souvent au moment où le kyste va s'ouvrir et ne disparaît que lorsqu'il est déjà formé. Lorsqu'elle existe, elle bat toujours.

On peut facilement obtenir l'enkystement des amibes dans une préparation microscopique qu'on laisse se dessécher très lentement. On observe dans ces conditions le rejet des vacuoles digestives après que l'amibe s'est arrondie et la transformation de la partie externe du protoplasma en l'enveloppe dure du kyste.

Les caractères de cette espèce la rapprochent assez de l'espèce que Frosch a employée et qu'il avait également isolée de la terre de jardin. Les kystes sont seulement ici d'un peu

plus grande dimension. Cette espèce d'amibes a été obtenue dans les conditions suivantes.

IV

RECHERCHE ET ISOLEMENT DE L'AMIBE

Une gélose très pauvre en matière nutritive, lavée à plusieurs reprises à l'eau distillée, est finalement transformée en gelée et stérilisée par chauffage à 120°. Cette gelée contient environ 20/0 de gélose sèche. On l'étale dans des boîtes de Pétri où on l'ensemence largement. Pour cela, on y répand une couche d'eau stérilisée dans laquelle on a d'abord délayé un peu de bonne terre (prise dans le jardin de l'Institut Pasteur) puis qu'on a laissé déposer les plus grosses particules de terre. L'ensemencement est donc fait avec le liquide légèrement trouble qui surnage; on enlève ensuite l'excès de cette eau. A la surface de la gélose ne tardent pas à apparaître de très maigres colonies bactériennes au milieu desquelles se déplacent des amibes qui bientôt deviennent très nombreuses. On reprend alors avec une aiguille de platine un peu de ces amibes et de ces bactéries et on lesensemence en un certain nombre de stries sur d'autres boîtes de Pétri contenant la même gélose. La culture bactérienne se développe cette fois sur les stries, et là aussi commence la multiplication des amibes. Mais celles-ci ne tardent pas à s'écarter de la ligne de culture, en cheminant en tous sens à la surface de la gélose. Au bout de quelques jours, un assez grand nombre d'entre elles peuvent s'être éloignées de 1 ou 2 cm., tandis que d'autres derrière elles continuent ce même mouvement. Il arrive alors que les unes continuant à errer à la surface du milieu de culture, les autres s'enkystent en donnant de place en place des amas fort caractéristiques (voir planche, fig. 1). C'est qu'en effet, au moment de s'enkyster, les amibes viennent s'appliquer les unes sur les autres, et il n'est pas rare de voir, en faisant une culture sur couche mince de gélose, de la manière que j'indiquerai plus loin, une amibe encore à l'état végétatif venir s'accoler à un amas de kystes déjà formé, et là s'arrondir et s'enkys-

ter à son tour. Quelle est la cause de cette agglomération? Peut-être les phénomènes de tension superficielle qui, comme plusieurs auteurs l'ont déjà montré, jouent un si grand rôle dans la biologie de ces êtres, doivent-ils être ici invoqués. Il est probable que l'amibe aplatie à la surface du milieu de culture peut s'arrondir plus facilement au contact de la saillie que font les kystes déjà formés à la surface de la gélose. Quoi qu'il en soit, les kystes sont si bien appliqués les uns sur les autres qu'ils deviennent polygonaux sur les faces par lesquelles ils se touchent (fig. 2).

On peut reprendre un amas de ces kystes et l'ensemencer à nouveau sur une gélose fraîche. Un certain nombre de bactéries toujours collées sur la paroi des kystes se multiplient alors et fournissent la nourriture nécessaire au développement des amibes. Les kystes éclosent, les amibes se multiplient, puis un certain nombre d'entre elles émigrent à leur tour hors de la colonie bactérienne, s'arrêtent à la surface de la gélose sur d'autres amas bactériens ou vont former en divers points du milieu de culture des amas de kystes au moyen desquels une culture pourra de nouveau êtreensemencée.

En opérant ainsi, dans des milieux très pauvres, on a toujours un faible développement de bactéries, et si la gélose est assez humide, une abondante multiplication d'amibes. Ces cultures d'amibes n'atteignent toutefois jamais la richesse des cultures bactériennes, et au lieu de former à la surface de la gélose d'épais amas visibles à l'œil nu, elles ne donnent qu'un léger dépoli, une apparence mate à la surface, partout ailleurs brillante, du milieu de culture.

V

CULTURES PURES MIXTES DE L'AMIBE

Les auteurs qui se sont occupés de la culture des amibes ne sont pas arrivés (à une exception près) à en obtenir en l'absence de bactéries *vivantes*. Aussi, renonçant provisoirement à obtenir des cultures pures, ne me suis-je proposé que d'obtenir ce que j'ai déjà appelé plus haut des cultures pures mixtes, c'est-à-dire des cultures

en présence d'une seule espèce microbienne. Cela me suffisait, comme je le montrerai, pour atteindre le but principal de ce travail qui est d'obtenir et d'étudier la diastase protéolytique des amibes. J'ai donc cherché à nourrir exclusivement d'une espèce bactérienne déterminée l'espèce que j'avais isolée. Je me suis servi le plus souvent dans ce but du *Bacterium coli commune*. Voici comment ont été conduites les recherches sur ce sujet.

De la gélose peu nutritive et assez molle est coulée en boîtes de Pétri. Au centre d'une boîte, on dépose, avec une anse de platine, une petite quantité d'une culture impure (contenant, outre les amibes, diverses espèces bactériennes). Les amibes ne tardent pas à se multiplier sur place, puis à émigrer en tous sens hors de la tache où elles avaient été placées d'abord. Elles vont ainsi, transportant avec elles quelques bactéries, former plus loin des amas de kystes ou même d'autres colonies lorsque les quelques bactéries qu'elles ont abandonnées en un point ont eu le temps d'y former une colonie microbienne.

Mais, sur la gélose, disposons de place en place des amas d'un microbe dont nous voulons nourrir notre amibe. Celle-ci, arrivant sur cet amas, au hasard de son cheminement à la surface de la culture, s'y multipliera plus ou moins abondamment, et, au bout de quelque temps, des individus formés dans cette colonie émigreront à leur tour dans toutes les directions. Ils contiendront dans leurs vacuoles digestives ou entraîneront collés à leur surface un nombre de microbes de l'espèce choisie beaucoup plus considérable que de toutes les autres espèces qui les accompagnaient préalablement, ce dont il est facile de s'assurer par des préparations microscopiques.

Cet entraînement de microbes par les amibes et l'extension des cultures bactériennes qui en résulte peuvent être vérifiés facilement à l'aide des cultures en boîte de Pétri dont la contamination par les microbes de l'air est facile. Quand la gélose se trouve ainsi spontanémentensemencée d'une colonie bactérienne dans une boîte qui ne contient pas d'amibes, cette colonie se développe, bien entendu, absolument isolée et conservant une forme généralement circulaire.

Supposons au contraire qu'on aitensemencé au centre de la boîte une tache d'amibes, et qu'à mi-chemin du bord se soit formée une colonie d'une bactérie facile à reconnaître à l'œil

nu, par exemple de *Micrococcus prodigiosus* ou de certaines sarcines jaunes. Lorsque les amibes atteignent cette colonie, elle ne tarde pas à être entourée *uniformément en tous sens* d'un grand nombre de petites colonies-filles dont le nombre et l'aire de dispersion vont sans cesse en augmentant. C'est ce que j'ai eu souvent l'occasion d'observer (voir planche, fig. 10). Cela prouve aussi que les amibes reviennent vers la tache centrale aussi bien qu'elles s'en éloignent et que leur marche, à la surface de la culture, est absolument désordonnée. C'est ce qu'on peut conclure aussi de l'aspect des *pistes* dont je parlerai plus loin.

Bien entendu, le microbe nouveau introduit dans la culture ne fait que s'ajouter ainsi à ceux qu'elle contenait déjà, mais il est en quantité prépondérante chez les amibes qui, dans la culture, ont dépassé son amas. Disposons maintenant les choses autrement. Autour de la tache centraleensemencée d'amibes, traçons des stries rayonnantes formées du microbe que nous voulons substituer aux autres. Les amibes s'avancent dans la culture beaucoup plus rapidement le long de chaque strie que dans les intervalles. Au fur et à mesure qu'elles cheminent, la culture se purifie et les microbes étrangers diminuent en nombre. On peut se rendre compte de son degré de pureté par des préparations microscopiques et mieux encore par des cultures répétées sur des milieux favorables aux bactéries. Quand les amibes ont atteint à la périphérie la limite des stries, on les reprend en ce point pour en ensemenecer la tache centrale d'une nouvelle boîte et ainsi de suite. L'expérience montre qu'au bout de plusieurs opérations, on peut le plus souvent obtenir ce que j'ai appelé une culture pure mixte. Ce n'est qu'une affaire de temps.

Ce procédé est, en somme, assez voisin de celui que Tsujitani a employé pour isoler l'amibe dont il a fait la culture en présence d'un vibrion cholérique et que j'ai rappelé plus haut. J'ai pu ainsi isoler l'amibe dont j'ai donné la description, en présence du *Bact. coli commune*, du *Vibrio Metchnikovi*, d'un *Vibrien cholérique* (var. dite de la Prusse orientale), du *Staphylocoque doré*, du bacille du charbon (var. asporogène), du bacille de la morve et même d'une petite espèce de levure (*Saccharomyces exiguus*) de taille assez faible pour que l'amibe puisse l'ingérer

facilement. On voit donc que l'amibe n'a pas manifesté d'exigences très spéciales au point de vue du choix de l'espèce dont elle se nourrit. Elle a aussi bien accepté le *B. coli* que la levure et a donné avec l'un et l'autre d'abondantes cultures. D'autres microbes toutefois ont paru moins favorables, et avec le *B. anthracis*, les cultures ont toujours été fort médiocres. Il m'a paru toutefois à plusieurs reprises que des microbes de cette espèce (var. asporogène), prélevés sur une vieille culture qui refusait de se multiplier à nouveau, et qui devaient donc être sinon morts, du moins très affaiblis, étaient acceptés plus facilement que ceux qui continuaient à se développer dans la culture concurrentement avec les amibes. Je n'ai pu poursuivre assez les expériences sur ce point pour arriver à une certitude absolue. Ce résultat ne serait pas forcément en contradiction avec le fait que les amibes refusent de se nourrir de microbes morts. Ceux qu'on leur offre sont généralement tués par la chaleur qui doit coaguler et ainsi modifier assez profondément leur protoplasme.

Lorsque les cultures ont été expérimentalement reconnues pures, on en prélève une petite quantité que l'on sème sur gélose inclinée dans des tubes à essai où l'on a eu soin d'ensemencer d'avance le microbe qui doit servir de nourriture afin que la culture puisse se développer rapidement. Après avoir pris, au bout de quelques jours, leur plus grande extension, ces cultures s'enkystent. Dans cet état, elles peuvent être conservées très longtemps, et, pourvu que la gélose ne soit pas devenue complètement sèche, elles peuvent encore être très facilement régénérées après plus de six mois.

J'ai dit que les meilleures cultures d'amibes étaient toujours peu abondantes. Aussi a-t-il fallu, pour la recherche de la diastase intracellulaire, faire des cultures sur de très grandes surfaces. Je me suis servi pour cela de grandes boîtes plates qui servent d'ordinaire pour la culture en grand des bacilles de la tuberculose ou de la peste. Chaque boîte offre une surface utile de plus de 2 décimètres carrés. On peut en stériliser un grand nombre à la fois dans un autoclave de Vaillard et Besson. Il est dans ces conditions possible, sinon facile, d'obtenir, en employant un matériel suffisant, une masse appréciable d'amibes, beaucoup moindre toutefois que la masse de microbes que

l'on pourrait obtenir sur une même surface de culture.

Ces boîtes offrent encore l'avantage de pouvoir être placées, comme les boîtes de Pétri, sous le microscope, et l'on peut y suivre la marche de la culture, chose indispensable si l'on veut récolter les amibes au moment où elles sont nombreuses et ne se sont pas encore enkystées.

On introduit dans les boîtes de la gélose obtenue par le mélange suivant : 100 c. c. de bouillon de veau ordinaire des laboratoires, 900 c. c. d'eau, 10 grammes de gélose; le tout doit être légèrement alcalinisé. On stérilise et l'onensemence avec une pipette le contenu délayé dans un peu d'eau stérile d'un des tubes de culture précédemment obtenus. On peut couvrir la gélose de liquide, puis aspirer de nouveau le liquide en excès pour ensemenacer d'autres boîtes, ou encore, ne lançant dans la boîte qu'une petite quantité de liquide, agiter pour la mêler à l'eau de condensation et faire couler le tout à la surface de la gélose qu'on couvre ainsi d'un réseau de traces liquides. La culture va commencer sur ces traces. Les bactéries se développent d'abord, marquant bientôt les régionsensemencées, puis les amibes se multiplient et l'on voit au microscope des amas de petites taches rondes réfringentes au milieu des bactéries. Elles commencent alors à envahir tout l'espace occupé par ces bactéries. Elles le remplissent tout entier vers le quatrième jour de la culture, et, dès ce moment, émigrent peu à peu dans l'espace encore libre qui se trouve entre les mailles du réseau. C'est alors qu'on peut apercevoir parfois (mais non toujours) de curieuses *pistes* réfringentes très sinueuses qui se croisent en tous sens et à l'extrémité de chacune desquelles on aperçoit une amibe. Peut-être faut-il en rapporter l'origine à l'excrétion de la vacuole pulsatile. Peut-être aussi convient-il de les rapprocher de ces filaments visqueux extraordinairement longs et fins que laissent après eux, d'après Leidy, en se retirant, les pseudopodes d'un amœbien testacé (*Diffugia lobostoma*).

Quoi qu'il en soit, dès que les amibes quittent la partie de la culture occupée par les bactéries pour la partie qui en est encore libre, elles changent d'aspect.

Elles étaient sphériques et de petit diamètre. Sans changer de volume, elles s'aplatissent et deviennent par conséquent plus larges et leur contour prend des formes variées. Comme

elles entraînent toujours avec elles un certain nombre de bactéries, la culture de celles-ci s'étend à son tour, et vers le 6^e ou 7^e jour, toute la surface est également peuplée d'amibes mobiles et de bactéries, et rien ne distingue plus les régions d'ensemencement. C'est le moment où l'on doit récolter la culture, pour obtenir le plus d'amibes à l'état végétatif et par suite la plus grande quantité de diastase.

Passé ce temps, le nombre d'amibes mobiles diminue très brusquement, et la culture se remplit d'amas parfois énormes de kystes dont j'ai décrit plus haut l'aspect très caractéristique. Les cultures peuvent alors être conservées comme semence. Lorsque les kystes ont vieilli dans une culture, un certain nombre d'entre eux sont vides et ne montrent plus que l'enveloppe extérieure ouverte; les autres ont un contenu uniformément granuleux. Je n'ai pu mettre en évidence à l'intérieur des kystes une sporulation donnant naissance à un très grand nombre de germes possédant chacun un noyau dérivé du noyau unique de l'amibe enkystée, comme cela a été figuré par Scheel¹ chez *A. proteus* où cet auteur estime à 400 le nombre des germes dans un seul kyste, comme cela a été vu aussi par Schaudinn² chez *Paramœba cilhardi*, une amibe assez aberrante, puisqu'elle a dans son cycle d'évolution des formes flagellées rappelant la forme *Cryptomonas*. Mais j'ai souvent aperçu dans les préparations des germes assez petits, généralement groupés par 2 ou 4, et qui ne sont nettement vacuolaires que lorsqu'ils ont une taille suffisante. On ne les observe pas lorsqu'on repique sur un milieu neuf des kystes qui viennent de se former dans une culture, mais seulement en réensemencant des kystes vieillis. Il y a lieu de penser que ces germes se forment dans les kystes par division du noyau et du protoplasme lorsque les kystes sont longtemps abandonnés dans un milieu défavorable. Au contraire, lorsqu'on réensemence les kystes aussitôt après leur formation, la division n'a pas eu le temps de s'accomplir à leur intérieur, et du kyste ne sort qu'une seule amibe.

J'ai observé autrefois un fait analogue chez les euglènes. Je l'ai d'ailleurs retrouvé depuis, exposé dans un travail de

1. SCHEEL, Beiträge zur Fortpflanzung der Amöben, *Festschr., f. v. KUPFER*, Iéna, 1899.

2. SCHAUDINN, *Sitzungsber. d. kgl. preuss. Akad. d. Wiss.* Berlin, 1896.

Garcin. Dans certaines conditions, ces êtres s'enkystent, et, suivant les circonstances, le noyau du kyste se multiplie ou non. Dans le premier cas, la masse intérieure prend l'aspect d'une *morula*; dans l'autre, elle est entièrement sphérique; et suivant le cas, il sort du kyste soit une seule euglène, soit un certain nombre de ces flagellés, mais de taille nécessairement plus petite.

Les cultures peuvent généralement être conservées au laboratoire, et leur développement y est le plus souvent assez rapide. Toutefois, pendant les grands froids de l'hiver où la température s'abaisse beaucoup la nuit, je me suis trouvé bien de les mettre à l'étuve à 22°. L'étuve à 37°, qui convient à la culture de la plupart des espèces bactériennes, ne saurait être employée pour les cultures d'amibes qui cessent de se multiplier et s'enkystent.

Avant d'aborder la question de l'extraction et de l'étude *in vitro* de la diastase des amibes, je crois bon d'exposer ici quelques observations microscopiques que j'ai pu faire sur les échanges des amibes avec le milieu extérieur. J'exposerai d'abord des faits relatifs à la digestion. Je dirai ensuite quelques mots des propriétés osmotiques du protoplasme de ces êtres.

VI

OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES SUR LA DIGESTION CHEZ LES AMIBES

On peut facilement observer l'amibe soit dans l'eau entre lame et lamelle, soit en goutte pendante, soit encore dans des conditions qui se rapprochent davantage de celles de mes cultures, en étalant à la surface inférieure d'une lamelle une goutte de gélose encore liquide, y ensemençant quelques kystes d'amibes et déposant la lamelle sur un porte-objet creux. On peut ainsi suivre l'éclosion des kystes et le cheminement des amibes sur la gélose, même avec l'objectif à immersion si la couche de gélose est suffisamment mince. J'ai indiqué plus haut l'aspect de l'amibe et son mode de progression. Je dois maintenant attirer l'attention sur un phénomène curieux, et qui peut

être dans la nutrition de l'amibe d'une grande importance.

AGGLUTINATION DES MICROBES PAR LE LIQUIDE DE LA VACUOLE PULSATILE. — Ce phénomène s'observe très bien chez les amibes nourries de *B. coli*. Lorsque ces amibes sont placées entre lame et lamelle et qu'elles étalent leurs pseudopodes, on voit souvent au voisinage de la vacuole pulsatile, qui, comme on le sait, occupe toujours une position périphérique, des amas nombreux de microbes dont un certain nombre s'agitent sur place sans s'éloigner de ce point. J'avais d'abord attribué ce fait à une chimiotaxie positive exercée par la sécrétion de la vacuole pulsatile. M. Borrel, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, m'a suggéré que l'apparence observée ressemblait exactement à une agglutination. Il est très vraisemblable que ce phénomène aide beaucoup à la capture des microbes par l'amibe, puisqu'il lui permet de les rassembler et de les retenir tout contre elle. On sait d'ailleurs que chez les animaux supérieurs dont les leucocytes s'adaptent à digérer rapidement une espèce microbienne déterminée, l'agglutination est quelquefois le prélude de la digestion et qu'elle la rend plus facile.

Cette propriété a surtout été observée chez des amibes nourries depuis longtemps exclusivement de *B. coli*. S'agit-il là, comme pour les leucocytes des vertébrés, d'une propriété acquise et est-elle limitée à l'espèce microbienne à laquelle l'amibe s'est adaptée? Nous penchons pour l'affirmative. En effet, nous n'avons jamais observé de phénomène semblable chez les amibes nourries de staphylocoque. Des amibes ordinairement nourries de levure ne nous ont pas paru non plus agglutiner le *B. Coli* qu'on y mêlait dans une préparation.

Je n'ai pas à insister ici sur l'englobement des microbes qui a été très bien décrit par un grand nombre d'auteurs et que j'ai exposé au début de ce travail. Je n'ai rien à ajouter à cette description. J'ai aussi rappelé les travaux qui ont été faits sur la variation de la réaction de la vacuole digestive chez l'amibe. J'ai suivi par deux procédés différents le sort des microbes ingérés dans la vacuole digestive : 1° par coloration sur le vivant, et 2° sur des préparations fixées.

COLORATION DES MICROBES DANS L'AMIBE VIVANTE PAR LE NEUTRAL-ROTH. — J'ai employé pour colorer les microbes dans l'amibe

vivante une substance qui a été introduite dans la technique par Ehrlich : le rouge neutre (*neutralroth*). Metchnikoff s'est aussi servi de ce colorant pour teindre les inclusions des vacuoles digestives chez les turbellariés et les actinies. On peut teindre par le même procédé les microbes englobés par les leucocytes des animaux supérieurs. Enfin, chez les infusoires ciliés, on obtient aussi avec ce réactif de très bonnes colorations du contenu des vacuoles digestives. Une propriété intéressante du *neutralroth* est de virer au jaune dans les milieux très alcalins et ensuite, lentement, du rouge cerise au rouge pourpre lorsque les liquides deviennent acides. Par leur coloration, les matières qui prennent la couleur dans les vacuoles attestent, dans tous les cas ci-dessus, une acidité plus grande que celle du milieu extérieur. Sur les indications de M. Metchnikoff, j'ai employé le même réactif pour colorer les bactéries ingérées par les amibes (voir planche, fig. 5). Elles se teignent d'une couleur d'un rouge plus foncé que les éléments qui ne sont pas englobés et manifestent ainsi que la réaction des vacuoles digestives est plus acide que celle du liquide extérieur. Ce sont seulement les éléments déjà morts qui se laissent colorer, et l'amibe elle-même finit par prendre la couleur si une trop grande concentration de la liqueur vient à la tuer. Si l'on colore au rouge neutre une amibe ayant absorbé uniquement des levures, un certain nombre restent incolores, d'autres prennent le rouge : ce sont celles qui sont déjà en voie de digestion.

COLORATION DES MICROBES EN VOIE DE DIGESTION DANS LES PRÉPARATIONS FIXÉES. — Les colorations faites sur des préparations fixées permettent de suivre avec plus de précision la transformation que subissent les microbes en voie de digestion dans les vacuoles digestives.

La méthode de coloration qui m'a donné les résultats les plus intéressants à ce point de vue est celle qui a été imaginée par Laveran pour la coloration des hématozoaires endoglobulaires et qu'il a employée aussi avec succès, en collaboration avec Mesnil, pour l'étude des trypanosomes.

On fait sur un porte-objet un frottis d'un peu de culture délayée dans une goutte d'eau. On étale et l'on fait sécher rapidement. On fixe ensuite par l'alcool absolu pendant dix minutes et l'on colore par un mélange en proportions déterminées de

bleu de méthylène à l'oxyde d'argent (bleu Borrel) et d'éosine, mélange qui doit être préparé au moment même de l'emploi, car il précipite rapidement. On différencie ensuite par le tannin à 5 0/0. L'endoplasme se colore en bleu violacé, l'ectoplasme souvent en bleu, les microbes en violet. Quant au noyau, il prend *en entier* une coloration pourpre. On n'y voit pas le karyosome : c'est la vacuole qui l'entoure qui prend la couleur, et sur des préparations mal colorées, on se rend compte qu'en réalité il prend une teinte bleu clair moins intense que celle du protoplasme. Dans quelques individus, le noyau est allongé et étranglé en son milieu; c'est le début d'une division directe. On sait que la division directe est de règle chez les amibes, bien que quelques espèces présentent une division karyokinétique comme cela a été indiqué pour *A. binucleata* par Schaudinn.

Les préparations faites avec des amibes nourries de diverses espèces microbiennes montrent les microbes dans les vacuoles digestives. On peut par le procédé indiqué bien mettre en évidence l'englobement du *B. coli* ou du vibrion cholérique. Les microbes remplissent les nombreuses vacuoles digestives qui réduisent à un réseau de mailles l'endoplasme interposé. Je n'ai toutefois pas réussi à observer une transformation des vibrions cholériques en boules comme cela se présente lorsqu'ils sont englobés par des leucocytes. M. Metchnikoff dit également avoir fait absorber à des paramécies du vibrion cholérique sans observer le même phénomène. Les préparations que l'on obtient avec des amibes nourries de levure sont fort belles. Elles montrent dans chaque vacuole digestive une et une seule cellule de levure qui la remplit presque complètement, la cavité de la vacuole n'étant représentée que par une mince auréole claire qui l'entoure.

Au point de vue de la digestion des microbes dans les vacuoles digestives, les plus intéressantes préparations ont été obtenues avec des amibes nourries de staphylocoque. Les microbes, à l'extérieur des cellules, prennent une belle coloration violette et il en est de même d'un certain nombre de ceux qui sont englobés. Dans plusieurs vacuoles, on trouve les microbes gonflés et prenant une couleur lilas pâle. Dans d'autres encore, ils sont réduits à l'état de granulations à peine teintées. Les pas-

sages entre les divers stades de ce processus de digestion peuvent être très facilement suivis sur les préparations (fig. 9).

VII

PROPRIÉTÉS OSMOTIQUES DE L'AMIBE

A. PÉNÉTRATION ET FIXATION DES MATIÈRES COLORANTES. — L'osmose semble, ainsi que nous l'avons dit, ne jouer aucun rôle dans la nutrition des amibes. Ce n'est pas cependant que leur protoplasme soit incapable d'être pénétré d'aucune substance. Nous pouvons mettre surtout en évidence cette pénétration à l'aide de matières colorantes capables de teindre dans la cellule certains éléments et qui, se portant exclusivement sur ces points, peuvent déceler même une très faible perméabilité de la matière vivante.

C'est à Brandt (1879) que l'on doit la première indication de cette introduction facile de certaines substances colorantes peu toxiques à l'intérieur de la cellule vivante. Plus tard, le botaniste Pfeffer (1886) a employé entre autres couleurs le bleu de méthylène dont Hertwig s'est aussi servi pour teindre sur le vivant le noyau d'œufs de métazoaires. Un grand nombre de couleurs telles que la vésuvine, le bleu de quinoléine peuvent ainsi pénétrer les cellules vivantes. Cette dernière couleur a ainsi été employée par Cetres pour teindre des granulations grasses chez des infusoires.

Nous-même avons utilisé plus haut cette facile pénétration dans les cellules du rouge neutre pour suivre dans les vacuoles digestives le sort des microbes englobés.

Une solution faible de bleu de méthylène donne assez rapidement au karyosome du noyau une teinte bleu clair tandis que la vacuole nucléaire qui l'entoure reste absolument incolore et que les microbes qui se trouvent dans les vacuoles digestives prennent une teinte bleue plus foncée. C'est cette apparence qui a été représentée sur la figuré 7 de la planche qui accompagne ce travail.

Il est curieux de noter que ce karyosome, qui fixe bien la

couleur lorsque l'animal est vivant, la fixe bien moins que le protoplasme lorsque l'amibe a été tuée et fixée soit par la chaleur, soit par l'alcool absolu ou l'alcool-éther. Le bleu de méthylène employé après ces fixations ne permet de discerner qu'assez mal le noyau marqué seulement au milieu de l'endoplasme par une tache un peu pâle, sans contours nets, et par l'absence de vacuoles digestives. On sait d'ailleurs que le noyau des protozoaires en général présente des propriétés spéciales au point de vue des colorations et que les couleurs qui différencient le noyau chez les métazoaires réussissent souvent mal au contraire chez eux.

Le même phénomène peut être observé chez les kystes au moins jeunes dans lesquels le karyosome du noyau se colore bien par pénétration très lente du bleu de méthylène, et ne se colore pas au contraire si l'on a employé quelque moyen de fixation.

Le bleu de méthylène n'est pas la seule couleur qui puisse pénétrer dans l'amibe vivante et la colorer. J'ai employé aussi le violet dahlia qui teint très vivement le karyosome. Mais cette couleur est certainement toxique, car lorsque le noyau se colore, on ne tarde pas à voir l'amibe, qui reste d'ailleurs bien étalée avec ses pseudopodes nets, ses vacuoles digestives remplies de microbes, prendre tout entière une coloration violet pâle et rester immobile.

J'ai obtenu des résultats semblables avec le rouge de ruthénium que j'ai pu employer grâce à l'obligeance de M. Nicolle. Ce réactif, dont l'emploi est malheureusement restreint en histologie à cause de son prix élevé, teint vivement le karyosome en rouge, mais le protoplasme prend en même temps une coloration rose pâle, comme il a été représenté sur la figure 8. Il faut noter que ce réactif continue à colorer l'amibe après la fixation par l'acide osmique qui gêne d'ordinaire beaucoup les colorations, et que, dans ces conditions, l'électivité du karyosome pour la couleur est maintenue.

Au point de vue de la pénétration des matières colorantes et de leur fixation sur le noyau, je pourrais répéter pour les kystes tout ce qui vient d'être dit pour les amibes, à ceci près que, la membrane prenant très vivement les couleurs, il est souvent difficile de voir les différences de coloration prises par les parties internes.

B. PLASMOLYSE DES KYSTES. — Si les amibes se laissent facilement pénétrer par de petites quantités de matières colorantes, qui s'y introduisent lentement, en revanche leur substance est peu perméable à un grand nombre de substances solubles dans l'eau telles que les sels. C'est ce qu'il est possible de montrer, sinon chez les amibes à l'état végétatif, au moins chez leurs kystes, par l'étude du phénomène de la plasmolyse.

Les kystes jeunes d'amibes que l'on trouve en très grande abondance dans une culture d'environ 8 à 10 jours permettent d'observer facilement ce phénomène de plasmolyse. Si, par exemple, nous plongeons dans une goutte d'eau salée à 2 à 3 0/0, sous le microscope, une petite quantité de kystes extraits d'une culture, nous voyons le protoplasme se rétracter, abandonnant en un certain nombre de points ou même parfois sur toute la surface de contact la paroi du kyste qui joue ici le même rôle que la paroi de cellulose dans les cellules végétales, et ne sert que de repère pour mettre en évidence la diminution de volume de son contenu. Elle-même ne subit aucune rétraction : ce n'est pas qu'elle soit très rigide, car lorsqu'on soumet les kystes à la dessiccation, on la voit se plisser très facilement; cela prouve seulement qu'elle est parfaitement perméable à toutes les substances qu'on peut mettre en solution dans l'eau. On peut le montrer pour les matières colorantes en plongeant des kystes dans l'eau salée à 2 0/0 colorée par le bleu de méthylène, puis remplaçant rapidement par de l'eau salée de même concentration non colorée. Les espaces abandonnés par le protoplasme restent colorés.

En disposant entre lame et lamelle un grand nombre de kystes et faisant passer des courants lents de solutions de diverses concentrations, on peut observer différentes phases de la plasmolyse. Une solution de concentration légèrement inférieure à la concentration limite ne produit aucun changement dans l'état des kystes. Pour une concentration un peu plus forte, on voit le protoplasme d'un certain nombre d'entre eux abandonner sur une surface peu étendue la paroi du kyste et dessiner en ce point un contour concave (voir planche, fig. 4). On se rend compte alors, en faisant un peu rouler les kystes avec précaution, que la plasmolyse se manifeste sur un nombre d'individus un peu plus considérable qu'on ne le penserait d'abord, parce

que la calotte le long de laquelle le protoplasme et la paroi sont détachés peut être vue de côté ou être placée au-dessus ou en dessous, points où elle est moins nettement visible. Si la concentration augmente encore, le décollement doit d'abord grandir, puis peut se faire en plusieurs points jusqu'à réduire le protoplasme d'une partie très sensible de son volume primitif. Cependant ce protoplasme n'est pas largement vacuolaire comme celui des cellules végétales, et l'on ne peut ici, comme on a voulu le faire ailleurs, expliquer la plasmolyse par un échange entre les « tonoplastes » de la cellule et le milieu extérieur. Les échanges d'eau ne peuvent avoir lieu dans le cas présent qu'entre la masse protoplasmique même et le milieu extérieur, ou mieux, si l'on attribue au protoplasme une structure finement alvéolaire, entre le liquide des alvéoles et ce milieu extérieur. Tout en pensant que les tonoplastes jouent, là où ils existent, un rôle important, nous devons conclure que leur présence n'est pas nécessaire à la manifestation du phénomène plasmolytique.

On peut aisément aussi, sur les kystes, mettre en évidence le phénomène inverse qui ramène le protoplasme de la cellule à son volume primitif, lorsque l'on vient à remplacer la solution plasmolysante par de l'eau pure ou seulement par une solution d'une concentration plus faible que la solution-limite. L'expérience se dispose de la même manière que précédemment en remplaçant les solutions les unes par les autres sous le microscope : pour cela, on ajoute d'un côté du couvre-objet quelques gouttes de la solution nouvelle et l'on aspire lentement l'ancienne de l'autre côté avec un fragment de papier buvard.

Pour ce qui concerne la comparaison de différentes substances au point de vue de leur pouvoir plasmolysant sur les kystes d'amibes, voici comment on peut opérer. Entre les solutions qui plasmolysent franchement et la solution-limite qui plasmolyse extrêmement peu, il y a toute une zone de passage établie par des solutions qui donnent une plasmolyse plus ou moins étendue ou, quand elle l'est très peu, visible sur un nombre plus ou moins grand d'individus. Cette zone est assez étroite, puisque les concentrations extrêmes peuvent être, pour une même substance, représentées par les nombres 14 et 17.

Mais on peut apprécier, avec une plus grande sensibilité, l'état de plasmolyse des kystes pour une concentration de la

zone de passage, et un observateur un peu exercé reconnaît facilement à 1/15 près la concentration d'une solution qui détermine une plasmolyse d'une certaine intensité. On peut ainsi, en employant un sel déterminé, établir l'échelle suivante :

Azotate de calcium.	
Concentration = 12,8.....	pas de plasmolyse.
13,7.....	plasmolyse très légère de quelques kystes.
14,6.....	plasmolyse nette.
15,5.....	— assez intense.
16,4.....	— très forte.

Pour comparer différents sels entre eux, je n'ai pas eu recours à l'analyse chimique, mais, prenant des sels purs et bien cristallisés, j'en ai fait des solutions dont j'ai mesuré la température de congélation. L'appareil employé pour mesurer ces températures était un appareil de Raoult. On déterminait le refroidissement par l'évaporation d'éther. On n'appréciait que le 50° de degré. Comme j'ai noté sous le nom de concentration l'abaissement de la température de congélation exprimée en 1/10 de degré, le chiffre décimal comporte une erreur de 1 à 2/10. La température de congélation n'a pas été prise directement pour chaque concentration, mais seulement, sauf quelques vérifications, pour deux solutions extrêmes. Les autres étaient obtenues par mélange de ces solutions, et l'on admettait que pour ces intermédiaires l'abaissement de la température de congélation pouvait être obtenu par interpolation, ce qui, entre — 1 et — 2°, peut être considéré comme exact¹. Voici les résultats de quelques mesures faites avec des kystes de la même culture que précédemment :

Oxalate de potassium.		Chlorure de sodium.	
C = 11,6.....	pas de plasmolyse.	C = 13.....	pas de plasmolyse.
12,4.....	—	14,2.....	plasmolyse légère.
13,2.....	—	15,4.....	— assez intense.
14.....	plasmolyse légère.	16,6.....	— très forte.
14,8.....	— nette.		
15,6.....	— intense.		
16,4.....	— très forte.		
Chlorure de baryum.			
C = 13,2.....	pas de plasmolyse.		
14,1.....	plasmolyse légère.		
15.....	— nette.		
15,9.....	— forte.		
16,8.....	— très forte.		

1. La précision de la méthode plasmolytique, avec quelque sorte de cellule qu'on opère, est très limitée. La comparaison avec des températures déterminées avec une très grande rigueur serait illusoire.

On peut conclure de ces mesures que, dans la limite de sensibilité du procédé employé, des solutions salines, ayant une même température de congélation, sont isotoniques vis-à-vis des kystes d'amibes.

VIII

PRÉPARATION DE LA DIASTASE DES AMIBES

A. RÉCOLTE DES AMIBES. — Lorsqu'on veut récolter les cultures d'amibes cultivées sur gélose dans des boîtes plates de manière à avoir le plus grand nombre possible d'individus mobiles bourrés de vacuoles digestives, il faut le faire généralement vers le 6^e jour de la culture, alors que la surface de la gélose a pris un aspect uniforme. En attendant plus longtemps, on récolterait surtout des kystes et la culture serait pauvre en diastase. Avec environ 50 c. c. d'eau qu'on agite rapidement à l'intérieur de la boîte, on enlève un très grand nombre d'amibes. On peut s'aider d'un râcloir en verre ou en fil de fer, mais on risque alors, si l'on n'opère avec de grandes précautions, d'enlever un peu de gélose dont on ne se débarrasse qu'incomplètement par des tamisages du liquide. Le liquide chargé d'amibes est porté dans une deuxième boîte, dans une troisième et ainsi de suite. On peut procéder à un second lavage des boîtes. On réunit tous les liquides obtenus.

On ne peut récolter les amibes sans une masse d'eau relativement fort considérable. Il faut ensuite enlever la plus grande partie de cette eau. C'est à quoi l'on arrive par une centrifugation. Les amibes, dont la densité est plus grande que celle de l'eau, se précipitent au fond. La précipitation des microbes a lieu aussi, mais elle est beaucoup moins rapide. On peut donc obtenir au fond du tube un dépôt assez cohérent d'amibes alors que le liquide qui surnage et qui en est débarrassé est complètement troublé par les bactéries. Avec la petite centrifugeuse à eau que j'employais, l'opération demandait une heure environ. On doit alors décanner le liquide avec précaution. Au fond du tube, on obtient un dépôt mou, blanc s'il est formé d'amibes mobiles presque exclusivement, au contraire jaune brun à la base s'il contient une assez forte proportion de kystes qui se préci-

pitent les premiers. Le dépôt contient encore un assez grand nombre de microbes pour que, si on le délaye dans l'eau et qu'on le soumette à une deuxième centrifugation, on obtienne encore au-dessus du dépôt d'amibes un liquide assez trouble. Néanmoins les amibes constituent de beaucoup la masse prépondérante d'un tel dépôt, et si on en étale une petite quantité entre deux lames de verre sous le microscope, on voit toutes les amibes, leurs pseudopodes rétractés et pressées les unes contre les autres, devenues polygonales par pression réciproque et offrant alors un aspect analogue à celui d'un parenchyme végétal. On reconnaît cependant très bien dans chacune d'elles le noyau, les vacuoles digestives et la vacuole pulsatile. C'est de ce dépôt que nous allons nous servir pour la préparation de la diastase. La quantité naturellement variable de dépôt que l'on obtient peut être évaluée en moyenne à $1/4$ de c. c. par boîte. Il faut d'ailleurs employer souvent d'assez grandes quantités de culture pour avoir de la diastase en quantité appréciable, et certaines expériences rapportées ci-dessous ont exigé l'emploi de 20 boîtes à elles seules.

B. PRÉPARATION DE L'EXTRAIT GLYCÉRINÉ. — La centrifugation terminée, le dépôt doit être traité immédiatement. On décante le liquide et on y ajoute quelques (2 à 3) c. c. de glycérine pour 1 c. c. d'amibes. On a soin de bien délayer de façon que la glycérine pénètre bien dans tous les amas. Si l'on regarde au microscope une goutte de ce liquide très trouble, on y voit flotter quantité d'amibes fortement ratatinées par la forte plasmolyse qu'a déterminée l'action du réactif. On peut en débarrasser dès lors la glycérine par une centrifugation. Le liquide glycérique contient dès ce moment la diastase protéolytique dont nous devons maintenant étudier les propriétés. On ne se débarrasse pas toujours à ce moment des corps d'amibes, mais souvent seulement quand on dissout plus tard la diastase dans l'eau. L'extrait glycériné peut être conservé quelque temps à la glacière. Il vaut mieux néanmoins en faire usage le plus rapidement possible.

C. PRÉPARATION DU LIQUIDE DIASTASIQUE. — Pour obtenir une solution aqueuse active à partir de l'extrait glycériné précédent, on ajoute à 10 c. c. de cet extrait environ 50 c. c. d'alcool à 90°. Il se fait presque aussitôt un abondant précipité floconneux que 10 minutes de centrifugation précipitent en une masse

parfaitement cohérente. On décante rapidement l'alcool et on redissout aussitôt le précipité dans l'eau; de même que tous les corps semblables, il perd en effet très rapidement son pouvoir diastasique par un contact prolongé avec l'alcool. On obtient un liquide trouble contenant encore en suspension avec les corps d'amibes un certain nombre de bactéries tuées par les opérations précédentes. On peut éliminer par une centrifugation rapide un certain nombre de ces éléments figurés. On filtre ensuite sur papier. Les cadavres d'amibes sont arrêtés. La filtration est lente et l'on est obligé de changer le papier plusieurs fois. Le liquide qui passe reste légèrement louche et contient encore de nombreux corps bactériens. Mais, conservé au laboratoire, il s'éclaircit complètement dans l'espace d'une nuit. J'aurai l'occasion de revenir sur ce sujet.

D. CHOIX DES CULTURES A EMPLOYER POUR L'ÉTUDE DES DIASTASES. —

Il n'est pas indifférent, pour l'étude des diastases que fournit l'amibe, de se servir de cultures où elle est accompagnée de telle ou telle espèce bactérienne. Il ne faut pas en effet que la diastase observée puisse être attribuée aux bactéries qui servent de proie à l'amibe. Les expériences dont je vais parler ci-après ont été faites avec une diastase obtenue dans des cultures pures mixtes d'amibes et de *Bacterium coli commune*, espèce connue comme très peu capable de protéolyse, qui ne liquéfie pas la gélatine dans ses cultures et ne s'autolyse pas, tandis que les espèces bactériennes très protéolytiques, comme par exemple le *B. anthracis* ou le vibrion cholérique, sont détruites, digérées par leurs propres diastases quand, après les avoir émulsionnées dans l'eau, on les tue à l'aide du chloroforme.

IX

ACTION PROTÉOLYTIQUE DE L'AMIBODIASTASE.

Le liquide diastasique que nous avons obtenu et que nous appellerons pour abrégé l'« amibodiastase », nom qui lui a été donné par M. Metchnikoff dans son ouvrage sur l'*Immunité dans les maladies infectieuses*, se montrera surtout actif sur les albuminoïdes. C'est ce qu'il était permis de prévoir si la dias-

tase est bien celle que contiennent les vacuoles digestives dont l'animal est bourré au moment où, par une brusque immersion dans la glycérine, nous l'avons tout à coup tué. Le liquide des vacuoles digestives digère en effet normalement des bactéries. C'est donc sur les albuminoïdes que nous étudierons d'abord son action.

A. ACTION SUR LA GÉLATINE. — Bien que ce corps soit peut-être quelque peu éloigné de ceux dont l'amibe fait ordinairement sa nourriture, la facilité avec laquelle on peut observer la liquéfaction de la gélatine, la généralité avec laquelle toutes les diastases protéolytiques la dissolvent, devaient nous porter à étudier d'abord sur elle l'activité de l'amibodiastase. Le temps plus ou moins long que demande pour se solidifier à une basse température donnée une gélatine imparfaitement digérée fournit aussi un repère commode de l'activité plus ou moins grande d'une diastase affaiblie. — Les recherches ont été faites avec une gélatine à 20 0/0 qu'on ramenait pour l'usage, par l'addition de diastase, d'eau, etc., à 10 0/0. On y ajoutait comme antiseptique une petite quantité de thymol. Dans quelques expériences de contrôle, on a remplacé le thymol par le chloroforme ou le xylol sans obtenir des résultats différents.

Pour vérifier l'action de l'amibodiastase sur la gélatine, il suffit de préparer deux tubes semblables contenant, en présence de la gélatine, respectivement la même quantité de diastase fraîche et de diastase chauffée 5 minutes à l'ébullition. Après quelques heures de séjour à l'étuve à 37°, le contenu du tube où l'on a mis la diastase fraîche ne se solidifie plus. Dans l'autre tube, au contraire, la gélatine se prend en gelée aussi facilement qu'avant l'opération.

On ne peut en aucune façon attribuer cette action à une diastase que pourrait sécréter le coli-bacille qui accompagne l'amibe dans les cultures. J'ai déjà rappelé que ce microbe ne liquéfie pas la gélatine dans les cultures qu'on en fait sur ce milieu. Si l'on fait des expériences directes de contrôle, soit à l'aide de macérations de microbes dans l'eau chloroformée, soit en traitant par la glycérine des microbes raclés d'une culture sur gélose comme je l'ai fait pour les amibes, on constate que les liquides obtenus n'ont sur la gélatine aucune action liquéfiant. Il en résulte que l'action observée précédemment reste tout entière

imputable à une sécrétion des amibes. Étudions maintenant les conditions de cette action.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — Nous rappelons que l'emploi de réactifs introduits dans les vacuoles digestives des amibes avait conduit un grand nombre d'auteurs à penser que la diastase qui y existe agissait dans les mêmes conditions que la pepsine. Voyons quelle réaction manifestera le milieu où se liquéfiera la gélatine sous l'influence de l'amibodiastase. Au lieu d'employer pour constater cette réaction le tournesol, je prendrai deux autres matières colorées, dont l'une vire pour une acidité plus grande, l'autre pour une acidité plus faible du milieu. Ce sont le méthylorange et la phénolphtaléine. Nous amenons deux masses égales de gélatine par addition respective d'acide phosphorique et de soude, la première à être acide au méthylorange et la deuxième à être alcaline à la phtaléine. Dans l'un et l'autre cas, le virage doit être dépassé de peu. Nous mêlons alors les deux gélatines dans diverses proportions qu'on peut représenter de la manière suivante, les deux liquides étant représentés par les lettres A et B.

5 c. c. A + acide, — 5 c. c. A, — 4 c. c. A + 1 c. c. B, — 3 A + 2 B, — 2 A + 3 B, — A + 4 B, — 5 B, — 5 B + soude.

On porte à l'étuve à 37° pendant 17 heures, — puis pendant 13 heures encore à 28°. Des tubes témoins contenant de la diastase bouillie avaient été adjoints aux tubes contenant de la diastase active. Voici les temps de solidification qui furent observés dans cette expérience :

Tube.	Temps de solidification.	
	Après 17 h.	Après 30 h.
5A + acide	5'	6'
— témoin	5'	6'
5A	6'	6'
4A + B	7'	6'
3A + 2B	11'	∞
2A + 3B	∞	∞
— témoin	2'	2'
A + 4B	∞	∞
5B	∞	∞
5B + soude	2'	2'

L'expérience achevée, il fut vérifié que 5 A était acide au méthylorange, 5 B légèrement acide à la phénolphtaléine. Il en résulte que la diastase employée a liquéfié la gélatine dans des

milieux acides à la phtaléine, mais alcalins au méthylorange. A la vérité, il y a eu un peu de liquéfaction même au delà de l'acidité au méthylorange, mais elle n'a pas été plus considérable que celle qu'on observe dans le tube témoin de même réaction et elle témoigne seulement que l'acidité du milieu suffit à liquéfier la gélatine. Cette action mise à part, il est facile de tirer du tableau précédent que c'est surtout entre la neutralité à la phénolphtaléine et la neutralité au tournesol (correspondant à peu près au mélange 2 1/2 A + 2 1/2 B) que la diastase se montre active.

Son activité se manifeste encore dans des milieux légèrement acides néanmoins au tournesol. Des expériences analogues qu'il est inutile d'exposer en détail confirment ce résultat. A la vérité, nous ne pouvons pas conclure *de plano* des résultats qui nous sont fournis par la gélatine à ceux que nous donneraient d'autres matières albuminoïdes. Celles-ci devront être étudiées à leur tour.

b) *Influence de la température sur la destruction de la diastase.* —

On sait que les diverses diastases sont toutes détruites par la chaleur, mais à des températures assez différentes. J'ai étudié de la manière suivante la destruction de l'amibodiastase par le chauffage. Des tubes contenant chacun un même volume (1 c. c.) de solution diastasique diluée dans un même volume d'eau (3 c. c.) sont soumis pendant trois quarts d'heure à des températures élevées différentes. Dans tous ces tubes, la réaction du liquide est la même (comprise entre la neutralité au tournesol et à la phtaléine du phénol). Après chauffage et refroidissement on ajoute à chaque tube une même quantité de gélatine, et tous les tubes sont portés à l'étuve à 37°. On les reprend au bout de 16 heures et, les plongeant dans l'eau froide, on compte le temps que met à se solidifier le contenu des divers tubes. Voici les résultats obtenus dans cette expérience.

Tubes chauffés 3/4 d'heure à 100°. — Temps de solidification.			
—	—	à 67°. —	3' 1/2.
—	—	à 63°. —	3' 1/2.
—	—	à 59°. —	5'
—	—	à 55°. —	∞
—	non chauffés.....	—	∞

L'expérience, plusieurs fois répétée avec des résultats analogues, montre bien l'affaiblissement considérable que la diastase

subit déjà au-dessous de 59°. Au-dessus de 60°, son activité disparaît complètement. Mais même au-dessous de 55°, l'activité de la diastase est déjà atténuée par la chaleur, et après un chauffage de trois quarts d'heure à 54°, on peut voir que la puissance de la diastase est devenue sensiblement égale à 1/10 de sa valeur primitive. C'est ce qu'il est facile de constater en ajoutant à la gélatine des quantités décroissantes de diastase fraîche ou chauffée et examinant pour tous les tubes en même temps les durées de solidification. Voici les résultats obtenus dans une telle expérience :

Diastase chauffée à :	Quantité de diastase.	Temps de solidification.
100° pendant 5'.....	2 c. c.	2'
62° — 45'.....	2 c. c.	2'
59° — —.....	2 c. c.	3'
56° — —.....	1 c. c. 1/2.	18'
— — —.....	1 c. c.	7'
— — —.....	1/2 c. c.	4
— — —.....	1/4 c. c.	3'
Non chauffée.....	1/2 c. c.	∞
—	1/8 c. c.	10'
—	1/16 c. c.	5'
—	1/32 c. c.	3 1/2

Ainsi l'amibodiastase se montre, au moins dans son action sur la gélatine, d'une très grande sensibilité à une élévation de température, même peu considérable, semblable en cela aux « alexines » contenues dans le sérum sanguin des mammifères et dont la température de destruction se montre tout aussi peu élevée.

c) *Influence de la température sur l'activité de la diastase.* — Des tubes contenant tous des quantités égales de diastase et de gélatine et dont l'un avait été porté pendant quelques instants à l'ébullition pour servir de témoin ont montré que l'activité de la diastase est plus forte au-dessus qu'au-dessous de 25°. Ainsi, tandis que le tube témoin se solidifiait en 2 minutes, deux tubes laissés quelques heures à 45° et à 37° restaient indéfiniment liquides dans les mêmes conditions, et un autre tube abandonné pendant le même temps à environ 20° faisait prise en 10 minutes. Mais l'activité de la diastase ne doit devenir nulle qu'à une température assez basse : c'est ainsi qu'un tube préparé de la même façon que les précédents, mais refroidi aussitôt et conservé 24 heures à 8°, a été réchauffé côte à côte avec un témoin le temps nécessaire à la liquéfaction de la gélatine. Celle-ci faisait prise ensuite par refroidi-

dissement en 4 minutes dans le tube conservé à 8°, en 2 minutes dans le témoin. Il paraissait bien *a priori* qu'il devait en être ainsi, car, à cette température, la vie des amibes se manifeste parfaitement et leur diastase doit être capable de digérer, dans ces conditions, les proies ingérées. En revanche, aux températures élevées, la diastase se montre active à des températures qui déjà sont très nuisibles aux amibes.

d) *Produits de digestion de la gélatine.* — Il ne semble pas que, au moins dans les conditions où je me suis placé, la transformation de la gélatine par la diastase protéolytique extraite des amibes soit poussée très loin. Il est vrai que je me suis servi d'un extrait diastasique faible ajouté en petite quantité à une grande quantité de gélatine, pour ne pas avoir à tenir compte des produits solubles (albumoses ou peptones) que la solution diastasique elle-même pourrait contenir. J'ai opéré sur environ 18 c. c. de gélatine à 20 0/0 approximativement. Cette gélatine ayant été maintenue quelques jours à l'étuve à 37° en présence de la diastase (avec addition d'une petite quantité de thymol) a été ensuite traitée par le formol, d'abord à la température ordinaire, ensuite à 110°. Après 10 heures d'action, le produit est complètement sec : on en a recueilli 3^{gr}, 28. On épuise par l'eau sur un filtre taré : celui-ci retient 0^{gr}, 7 de matière représentant la gélatine non transformée. Le liquide filtré et partiellement évaporé est précipité par le sulfate d'ammoniaque à saturation. Le filtrant à nouveau, on obtient un liquide qui ne contient pas sensiblement de peptones, car il ne donne pas la réaction du biuret. Bien que cette réaction ait pu être gênée par la grande quantité de sulfate d'ammoniaque présente dans la liqueur, elle se serait produite cependant dans ces conditions si la quantité de peptones avait été tant soit peu considérable, et il semble bien, vu l'abondance du précipité produit par le sulfate d'ammoniaque, que celui-ci a entraîné sensiblement toutes les matières dissoutes. Ainsi l'action de la diastase paraît s'être arrêtée, au moins en très grande partie, à l'état de transformation peu profonde qui caractérise les « albumoses ». Peut-être ces produits sont-ils assimilables directement par la cellule amébienne. Au reste, des matières analogues à la gélatine doivent se rencontrer rarement dans la nutrition naturelle des amibes, et nous verrons l'amibodiastase pousser plus loin la

transformation d'autres albuminoïdes plus voisins de ceux qui forment leur nourriture ordinaire. J'ai surtout mis, comme je l'ai dit, la gélatine en tête de cette étude à cause de sa facile liquéfaction et de la possibilité de caractériser par des chiffres l'intensité des actions obtenues.

J'ai cherché encore avec la gélatine si l'on pouvait mettre en évidence l'action d'une *sensibilisatrice*, si, par un chauffage ménagé de la diastase, on obtiendrait comme avec le sérum sanguin un liquide inactif par lui-même, mais capable d'augmenter l'activité du liquide non chauffé. Le chauffage a été fait à 60° pendant trois quarts d'heure. On a fait les mélanges suivants, volume à volume : liquide non chauffé + liquide chauffé à 100° (1); non chauffé + chauffé à 60° (2); chauffé à 60° + chauffé à 100° (3); 2 volumes de liquide chauffé à 100° (4). Agissant sur des quantités égales de gélatine, les tubes (1) et (2) ont donné ensuite le même temps de solidification; — (3) et (4) (témoin) ont donné le même temps. On n'a donc pu mettre en évidence ainsi aucune sensibilisatrice.

B. ACTION SUR LA FIBRINE. — La fibrine sur laquelle a été essayée l'action de la diastase est de la fibrine de porc conservée dans la glycérine et chauffée pendant 2 heures à 58° dans la solution physiologique de NaCl à 7 0/00. On sait que cette précaution est indispensable à la correction des expériences. Non chauffée, la fibrine entraîne avec elle, en se séparant du sérum sanguin, une diastase protéolytique qui la dissout spontanément quand on la met à l'étuve en présence de solution physiologique et d'un peu de chloroforme. Chauffée à une température supérieure à 58°, la fibrine change évidemment d'état d'aggrégation. Elle devient plus dure et cassante et elle est plus difficilement attaquable. Le chauffage ménagé indiqué ci-dessus et qui suffit à empêcher la digestion chloroformique de la fibrine, tout en la laissant bien attaquable par les diastases protéolytiques, est donc à employer¹.

L'action de l'amibodiastase sur la fibrine ainsi préparée m'a d'abord paru nulle. C'est que je plongeais la fibrine dans la solution diastasique faite avec de l'eau distillée. En remplaçant celle-ci par la solution physiologique de sel marin à 7 0/00, on

1. Ce procédé, recommandé par M. Delezenne, a déjà été employé par M. Mesnil dans son travail sur les *Diastases des Actinies*.

obtient au contraire, à l'étuve à 37°, une dissolution très nette et très rapide de la fibrine. Certainement ce résultat peut être attribué en partie à l'altération que subit la fibrine quand on la maintient au contact de l'eau distillée, et il est certain que dans ces conditions elle devient moins attaquable. Je ne pense pas toutefois que la totalité du phénomène doive être expliquée de cette manière, car même la fibrine, maintenue quelque temps dans l'eau distillée, se laisse bien dissoudre ensuite par la diastase en solution salée, et l'on est ainsi conduit à admettre l'influence très grande du sel sur l'action de la diastase. Cette influence, dont M. Duclaux a souvent signalé l'importance à propos d'autres actions diastasiques, apparaît ici avec la plus grande netteté. En comparant l'influence que la présence du sel exerce sur l'action de l'amibodiastase avec celle qu'elle a sur une pepsine ou une trypsine commerciale, on constate que cette influence est ici beaucoup plus grande. Peut-être faut-il admettre que les diastases qui agissent intracellulairement ont des conditions d'action plus étroites, sont moins souples que les diastases extracellulaires qui forcément agissent souvent dans des milieux de composition un peu plus variable.

Comme nous l'avons fait pour la gélatine, nous allons étudier pour la fibrine les principales influences qui modifient l'activité de la diastase. Les détails nombreux que nous avons donnés à propos de la digestion de la gélatine nous permettent d'être ici plus bref et nous insisterons seulement sur les phénomènes nouveaux que nous rencontrerons.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — La réaction du milieu qui convient à la digestion de la gélatine par l'amibodiastase convient aussi à la digestion de la fibrine. La digestion est donc nulle lorsque l'alcalinité est supérieure à celle qui fait virer la phénolphthaléine. En deçà de cette limite jusqu'à la neutralité au tournesol et même un peu au delà, il y a digestion. L'action cesse lorsqu'on s'approche du virage au méthylorange, et pour une acidité supérieure à celle qui produit ce virage, la fibrine se trouve bien gonflée par l'acide, mais nullement digérée par la diastase. Ainsi le résultat obtenu d'abord avec la gélatine se maintient vrai avec un albuminoïde incontestable.

b) *Influence de la température sur l'activité et la destruction de la diastase.* — L'amibodiastase se montre active sur la fibrine

aux mêmes températures que sur la gélatine. Je n'ai pas vérifié toutefois son activité au voisinage de 10° . Les mêmes chauffages qui affaiblissent et détruisent l'action sur la gélatine agissent de même à l'égard de la fibrine. Ainsi l'activité se trouve très réduite à 58° et nulle au-dessus de 60° . Je n'ai donc rien à ajouter sur ce point aux résultats obtenus plus haut.

c) *Fixation de la diastase sur la fibrine.* — L'amibodiastase se fixe sur la fibrine comme le font généralement les diastases qui attaquent cette substance. Plaçons dans deux tubes deux fragments égaux de fibrine. Dans le premier, mettons de l'eau physiologique, dans le deuxième de la diastase dissoute dans le même liquide. Abandonnons les deux tubes quelques heures à la glacière, puis changeons de tube nos flocons de fibrine et portons le tout à l'étuve. Le fragment qui a pu s'imprégner de diastase dans le deuxième tube se dissout dans le premier. L'autre se trouve à l'étuve dans le deuxième tube dont la diastase a été enlevée et reste tout à fait ou presque inaltéré.

d) *Produits de digestion de la fibrine.* — Lorsque la fibrine se trouve placée à l'étuve dans le liquide diastasique, elle devient d'abord grisâtre et très friable. Elle ne tarde pas, si l'on agite le tube qui la contient, à se résoudre en une poudre grise contenant souvent des fragments plus ou moins gros et qui se précipite au fond. Lorsque la quantité de diastase est suffisante, la fibrine altérée finit par disparaître presque complètement. Certainement la diastase que j'ai obtenue n'a pas l'activité de la trypsine, par exemple, et l'on a quelque peine à mettre en évidence les produits de dégradation avancée de la fibrine.

Je n'ai jamais obtenu ces très abondants cristaux de tyrosine que l'on rencontre dans les digestions tryptiques. Toutefois, en évaporant doucement le liquide de digestion, on peut mettre en évidence l'existence de ce produit. On obtient alors de petits cristaux très peu solubles dans l'eau froide, mais solubles dans l'eau chaude et dans l'ammoniaque d'une part, dans les acides de l'autre. Enfin et surtout, ces cristaux, quoique petits, présentent bien la forme caractéristique en double éventail qui ne laisse aucun doute sur leur nature. Je rappelle que M. Mesnil n'a pu obtenir aussi que de fort petits cristaux de tyrosine par l'action de l'actinodiastase sur la fibrine, bien que la digestion fût parfaitement nette.

Une réaction qui a donné au même auteur les meilleurs résultats a également très bien réussi avec les produits de digestion de la fibrine par l'amibodiastase. C'est la réaction du *tryptophane* ou *bromkörper*, corps qui accompagne toujours la tyrosine dans les digestions tryptiques, et que l'on ne trouve pas dans les digestions pepsiques. Le liquide de digestion de la fibrine auquel on ajoute de l'eau de brome fraîchement préparée prend une coloration d'abord rose, qui devient violette en même temps qu'il se forme de légers grumeaux. Ces grumeaux violets finissant par se précipiter laissent parfaitement incolore le liquide surnageant. Cette réaction, que V. Harlay a récemment indiquée comme caractérisant très nettement les digestions tryptiques, rapproche bien, comme un certain nombre d'autres caractères déjà étudiés, l'amibodiastase de la trypsine. Je n'insisterai pas ici sur les ressemblances que tous ces caractères lui donnent avec l'actinodiastase de Mesnil et les autres diastases intracellulaires, me réservant de faire plus loin cette comparaison.

Des expériences de contrôle ont naturellement été faites avec la fibrine comme avec la gélatine pour mettre en évidence s'il n'y avait aucune action digestive due aux microbes accompagnant les amibes. Ni dans les cultures en bouillon chloroformées et portées à l'étuve, ni dans le liquide obtenu de la même manière que l'amibodiastase avec le produit de râclage de cultures en gélose de *B. coli*, je n'ai obtenu de digestion de fibrine, et l'action ici encore doit bien être tout entière rapportée à l'amibe.

C. ACTION SUR L'ALBUMINE. — J'ai fait quelques expériences sur la digestion de l'albumine cuite très finement émulsionnée que l'on peut obtenir en coagulant par la chaleur du blanc d'œuf dilué dans l'eau et amené d'abord à la neutralité au tournesol. Bien que cette émulsion soit très fine et présente par suite une large surface d'attaque à l'action digestive, cependant le changement observé dans l'émulsion après un certain nombre d'heures d'étuve, quoique net, reste toujours faible.

On a pu l'observer de la manière suivante : deux tubes semblables sont placés côte à côte, contenant la même quantité d'émulsion et de diastase et ne différant que parce que dans l'un (témoin), le liquide diastasique a été préalablement bouilli.

Les deux tubes sont identiquement troubles après le mélange, et après 16 heures d'étuve, il y a éclaircissement du tube contenant la diastase active, ce qu'on peut constater par comparaison. On peut conclure de ceci que l'action de la diastase sur un albuminoïde coagulé par la chaleur est faible. La digestion des microbes nous conduira à la même conclusion.

D. ACTION SUR LES MICROBES. — L'amibodiastase dissout très activement les corps de microbes morts. Lorsque, dans la préparation du liquide diastasique, on filtre sur papier, j'ai déjà dit qu'on obtient un liquide encore troublé par des corps bactériens immobiles et que ce liquide, abandonné à lui-même sur la table du laboratoire, s'éclaircit spontanément en 12-24 heures. On n'observe pas que les microbes se soient précipités, et après agitation, le liquide reste parfaitement limpide. Si d'ailleurs, pendant l'éclaircissement du liquide, on en fait de temps à autre des préparations microscopiques, on voit les microbes se réduire d'abord à l'état de granules, puis disparaître petit à petit du liquide. Or le *coli-bacille* est un microbe qui ne secrète que peu ou pas de diastase protéolytique et est incapable de subir l'autolyse comme cela arriverait, par exemple, avec le *B. anthracis* : un liquide chloroformé dans lequel on fait macérer du *coli-bacille* reste indéfiniment trouble. La dissolution des corps microbiens dans ces conditions ne peut être attribuée qu'à la diastase sécrétée par l'amibe.

On a pu, en faisant expérimentalement agir la diastase sur des émulsions très fines de corps microbiens, obtenir la dissolution de ces corps. Si, par exemple, nous ajoutons, dans deux tubes à essai contenant la même quantité de liquide diastasique et dans l'un desquels le liquide a seulement été bouilli (témoin), un même nombre de gouttes d'une émulsion de *coli-bacille* tenue quelque temps au contact du chloroforme, les deux tubes, qui sont d'abord d'une égale opacité, présentent, après quelques heures de séjour à l'étuve, une différence bien nette ; le liquide devenant, dans celui où la diastase est active, d'abord transparent et même ensuite complètement limpide si la quantité de diastase employée est assez considérable.

On a répété avec le *coli-bacille* des expériences analogues à celles qui avaient été faites avec la gélatine et la fibrine, dans le but de connaître les conditions dans lesquelles s'accomplit cette

protéolyse. Ces conditions se sont montrées identiques à celles où se manifeste sur d'autres substances l'activité de l'amibo-diastase.

a) *Influence de la réaction du milieu.* — Par l'addition d'une petite quantité d'acide phosphorique dilué d'une part, de soude caustique d'autre part, on amène deux parties d'une même émulsion de coli-bacille tué par un contact prolongé avec le chloroforme, respectivement à la neutralité au méthylorange et à la phénolphtaléine. Les deux liquides, après avoir été additionnés de quantités égales de liquide diastasique, sont mêlés dans diverses proportions. Appelant A le liquide acidulé, B le liquide alcalinisé, nous pouvons représenter ainsi le contenu des divers tubes où nous plaçons ces mélanges :

5 A, 4 A + B, 3 A + 2 B, 2 A + 3 B, A + 4 B, 5 B

Le virage du tournesol se place au voisinage (un peu à droite) de 3 A + 2 B. L'éclaircissement a été maximum dans 2 A + 3 B, un peu plus faible dans 3 A + 2 B et A + 4 B. Il était encore plus faible dans 5 B (un peu moins alcalin que le virage de la phtaléine), et nul dans 5 A (un peu moins acide que le virage du méthylorange). Nous pouvons représenter ces résultats dans le tableau suivant :

<i>Virage du méthylorange.</i>		
5A.....	éclaircissement nul.	
4A + B.....	—	médiocre.
3A + 2B.....	—	assez grand.
<i>Virage du tournesol.</i>		
2A + 3B.....	—	maximum.
A + 4B.....	—	assez grand.
5B.....	—	médiocre.
<i>Virage de la phtaléine.</i>		

La réaction optima coïncide donc bien avec celle qui a été déterminée pour les autres substances étudiées.

b) *Températures d'activité et de destruction de la diastase.* — La diastase se montre active sur le coli-bacille dans les mêmes conditions que pour les substances précédemment étudiées, c'est-à-dire jusqu'au delà des températures qui sont fatales à l'amibe. — Pour rechercher quelle température détruisait la diastase agissant sur le microbe, on a encore employé la même émulsion de coli-bacille tué par le chloroforme qui a servi aux expériences précédentes. Le liquide diastasique a été chauffé à différentes

températures pour les différents tubes d'essai, puis additionné dans chaque tube d'une égale quantité d'émulsion de coli-bacille. Après 20 heures à l'étuve à 37°, les tubes sont examinés : le résultat de cet examen est consigné dans le tableau suivant :

Température et durée du chauffage.	Résultat obtenu.
5 minutes à 100° (témoin).....	éclaircissement nul.
45 — à 62°.....	—
45 — à 56°.....	intermédiaire.
Pas de chauffage préalable.....	complet.

Cette expérience, bien moins précise que celle qui a été faite avec la gélatine, en corrobore tout à fait les résultats.

c) *Action de la diastase sur diverses espèces microbiennes.* — On pouvait se demander si la diastase de l'amibe nourrie de coli-bacille depuis un certain temps dissout ce microbe de préférence à tout autre. Pour répondre à cette question, on devait mettre en présence de la diastase amœbienne des microbes morts de diverses espèces, de manière à en former des émulsions également opaques, puis on devait chercher si toutes s'éclaircissaient à l'étuve et dans quel ordre. Cette expérience comporte une cause d'erreur avec un grand nombre d'espèces qui, au contraire du coli-bacille, sécrètent de grandes quantités de diastase protéolytique. Lorsqu'on tue ces microbes au moyen du chloroforme, cette diastase fait subir aux corps microbiens une « auto-digestion » ou « autolyse » à laquelle j'ai déjà fait allusion, et qu'il faut éviter si l'on veut que l'expérience soit correcte. On est alors conduit à chauffer ces émulsions microbiennes pour en détruire la diastase. Mais on se heurte alors à une autre cause d'erreur, parce que de cette manière on coagule plus ou moins les alhaminoïdes dont les microbes sont formés et on les rend ainsi moins sensibles à l'action de la diastase. J'ai rangé ci-dessous par ordre d'éclaircissement des tubes les noms des microbes mis en expérience, avec l'indication du mode de préparation de l'émulsion, en commençant par le microbe le plus facilement dissous :

<i>B. coli commune</i> (chloroformé).			
<i>B. typhique</i> (chloroformé).			
Staphylocoque doré	(chauffé à 100°, puis chloroformé).		
<i>Vibrio Metchnikovi</i>	—	—	—
<i>B. anthracis</i> , var. asporogène	—	—	—

On voit que les microbes chauffés sont moins facilement dissous que ceux qui sont simplement tués par le chloroforme. J'ai d'ailleurs pu constater que le coli-bacille lui-même est moins facilement dissous après un moment d'ébullition de l'émulsion. Cela n'empêche pas ces microbes de présenter entre eux des différences assez considérables au point de vue de leur dissolution, le *B. anthracis*, par exemple, n'étant sensiblement pas attaqué, tandis que le staphylocoque montre une dissolution nette. On ne peut tirer argument de la digestion du *B. coli*, plus facile que celle du staphylocoque, pour affirmer une adaptation de la diastase, les microbes ne se trouvant pas présentés dans les mêmes conditions. On peut remarquer toutefois que le *B. coli* est un peu plus facilement dissous que le *B. typhique*, espèce très voisine et préparée de la même manière.

Après avoir constaté la digestion par l'amibodiastase des corps microbiens tués par la chaleur ou par le chloroforme, il s'imposait de rechercher son action sur les microbes vivants. C'est ce que j'ai tenté de faire sans succès. Le *B. coli* vivant, émulsionné dans l'eau stérile ou dans la solution physiologique stérile, et auquel on ajoute de la diastase, n'est pas détruit par un séjour prolongé à l'étuve.

La diastase extraite des amibes ne présente non plus, vis-à-vis des microbes, aucun pouvoir agglutinant, ce qui est curieux si l'on rapproche ce fait de l'agglutination très nette que l'on peut constater autour de la vacuole pulsatile. Il faut peut-être conclure de là que la matière agglutinante est exclusivement due à la vacuole pulsatile, que les vacuoles digestives n'en contiennent pas et qu'elle est rapidement fixée par les microbes.

J'ai recherché également sans succès si le sérum des animaux immunisés contre le *B. coli* contiendrait une sensibilisatrice capable d'exalter l'action de l'amibodiastase sur les émulsions chloroformées de ce microbe. Un sérum de cheval immunisé m'a été procuré par M. Lesage : ce sérum avait sur le *B. coli* un pouvoir agglutinant très manifeste. Ajouté à la diastase, il ne paraît pas augmenter la rapidité de l'éclaircissement de la dissolution. Mais les tubes en expérience sont difficiles à comparer, à cause du phénomène d'agglutination qui ne se présente pas dans le témoin.

APPENDICE

RECHERCHE D'AUTRES DIASTASES. — J'ai cherché à mettre en évidence dans l'amibodiastase la présence de diastases non protéolytiques. Je n'ai pu obtenir de saponification appréciable de la monobutyryne. En revanche, l'iode et la liqueur de Fehling permettent de constater la présence d'une petite quantité d'amylase. Mais cette diastase ne peut être sûrement rapportée à l'amibe, car le *B. Coli* en produit aussi.

On peut faire la même observation à propos de la présure dont la présence dans l'amibodiastase peut être constatée.

X

L'AMIBODIASTASE EST BIEN LA DIASTASE INTRACELLULAIRE DES AMIBES

L'amibodiastase dont j'ai indiqué le mode de préparation et étudié les actions est bien une diastase extraite de l'amibe, comme je l'ai montré plus haut en faisant voir que les cultures pures du microbe accompagnant l'amibe sont incapables de donner un produit agissant semblablement. Ni émulsion ni culture en bouillon de *B. coli* ne nous ont donné de diastase active. J'expose ici quelques expériences qui permettront de mieux voir encore que la présence et la quantité d'amibodiastase sont liées à la présence et à l'abondance d'amibes dans un milieu donné.

Ces expériences ont été faites, non à l'aide d'extrait glycé-
riné, mais avec des émulsions dans l'eau de microbes et
d'amibes tués par le chloroforme.

Un dépôt centrifugé d'amibes, préparé comme pour le traitement par la glycérine et traité par le chloroforme après émulsion dans l'eau (ou la solution physiologique), donne un liquide dissolvant la gélatine et la fibrine.

Le liquide chargé d'amibes, que l'on recueille des boîtes de culture, traité par le chloroforme, dissout la gélatine. Il fait subir à la fibrine un commencement de digestion : la fibrine devient grise et friable et tombe en petits morceaux au fond du tube où l'on fait l'expérience

Le même liquide décanté après centrifugation et traité de la même manière est dépourvu de toute action sur la gélatine et la fibrine.

..

Non seulement cette diastase vient de l'amibe, mais encore nous devons la considérer comme la diastase intracellulaire que l'on voit agir sur les matières alimentaires dans les vacuoles digestives. Je voudrais établir ici qu'il y a accord à ce sujet entre les observations microscopiques et celles que j'ai pu faire *in vitro*, et que les propriétés attribuées à l'une et à l'autre permettent de conclure à leur identité.

J'ai montré que l'amibodiastase est surtout protéolytique. Elle agit sur la gélatine, sur la fibrine et sur les corps de microbes morts, en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide au tournesol, mais toujours alcalin au méthylorange et acide à la phtaléine. En agissant sur la fibrine, elle donne de la tyrosine.

La diastase, dont les effets ont été étudiés au microscope, est aussi surtout protéolytique. Elle ne paraît digérer ni les graisses, ni sensiblement l'amidon. Une propriété importante semble d'abord la différencier de notre amibodiastase; elle dissout les albuminoïdes en milieu acide; au moins écrit-on ainsi souvent. Il serait plus exact de dire qu'elle digère en milieu plus acide que le liquide extérieur où vivent les amibes, et ce liquide est généralement fort alcalin.

Nous avons précédemment constaté, à l'aide du rouge neutre, comme on l'a fait auparavant avec le tournesol ou l'alizarine sulfoconjuguée, l'acidification progressive des vacuoles digestives. C'est là un fait qui doit être mis hors de doute. Mais nous avons vu que Le Dantec, par exemple, n'était pas le plus souvent arrivé à déceler cette acidification avec le tournesol, et qu'il avait dû pour cela employer un réactif capable d'indiquer une acidité beaucoup plus petite.

On sait que dans l'eau pure dans laquelle on fait dissoudre une petite quantité de soude, l'addition d'acide chlorhydrique amène à un certain moment un passage brusque à la réaction acide, que tous les réactifs colorants indiquent sensiblement au même moment.

Au contraire, par l'addition d'acide phosphorique, le passage de l'une à l'autre réaction se fait par deux ressauts brusques¹ que sépare une sorte de plateau incliné; ces deux ressauts correspondent respectivement à l'addition dans la liqueur de $1/2$ et de 1 molécule-gramme d'acide phosphorique pour 1 molécule-gramme de soude, et entre eux l'acidité du liquide n'augmente que lentement. La plupart des acides polybasiques donneraient lieu à un phénomène analogue. De même le mélange d'un acide fort et d'un acide faible. Bref, si l'on se trouve en présence d'un mélange complexe de bases et d'acides forts et faibles, on pourra, par addition d'acide, ne passer de l'alcalinité forte à l'acidité forte que par une sorte de rampe inégale de forme variable suivant les mélanges et dont les divers réactifs colorés indiqueront les différents points. Les réactifs qui virent pour une acidité au voisinage de laquelle l'augmentation est lente dans le milieu considéré ne donneront qu'un virage lent et progressif.

C'est ce qui arrive toujours dans les liquides chargés de matières organiques tels que ceux dans lesquels vivent les amibes. C'est ce qui arrive assurément aussi à l'intérieur de leurs vacuoles digestives. Là, comme dans le liquide ambiant, il y a certainement toujours une certaine quantité de phosphates. La présence de sels à composants (acides ou bases) plus ou moins forts ou faibles, et notamment de phosphates, explique l'existence de ces *zones sensibles* dont Le Dantec parle à propos de l'alizarine sulfoconjuguée et que l'on peut retrouver pour les autres réactifs qui ont servi de réactifs physiologiques¹. Ces substances : l'alizarine, le *neutralroth*, le tournesol, présentent ce caractère commun, lorsqu'on les met dans une solution de soude qu'on acidifie petit à petit avec de l'acide phosphorique,

1. Je parle ici de l'acidité et de l'alcalinité comme de grandeurs numériquement définies susceptibles de croître ou de décroître. Il faut rappeler que des notions de physico-chimie sur lesquelles je n'ai pas à insister permettent en effet de déterminer numériquement l'acidité d'un liquide. On peut alors tracer des courbes d'acidification des liquides par addition d'un acide. C'est à ces courbes que correspondent les expressions de ressaut, de plateau, etc. Voir les courbes de Böttger : *Zeitsch. f. physik. Chemie*, XXIV, p. 295.

1. En réalité, on se trouve toujours dans la pratique placé dans le cas d'un mélange d'acides forts et faibles, même lorsqu'on mêle de l'acide sulfurique à de la soude, celle-ci introduisant toujours un peu d'acide carbonique dans le mélange. C'est pourquoi ce mélange a fourni à Le Dantec avec l'alizarine une zone sensible appréciable.

de présenter à un moment un virage assez brusque précédé ou suivi d'une série de teintes qui vont se succédant l'une à l'autre par transitions insensibles. J'ai cru bon de résumer dans un tableau les variations des teintes de ces différents réactifs dans les conditions que je viens d'indiquer. En présence de mélanges complexes d'électrolytes tels que les présentent les milieux naturels, le tableau pourrait se modifier un peu, mais son allure générale serait certainement conservée.

QUANTITÉ de soude.	MÉTHYLORANGE	ALIZARINE	TOURNESOL	ROUGE NEUTRE	PHTHALEINE du phénol.
0 c. c. 9				Rouge vineux.	
1		jaune orangé pâle. Virage complet.	Rouge franc.		
1,1		Rouge orangé.			
1,2	Virage.				
1,3					
1,4					
1,5					
1,6					
1,7					
1,8					
1,9					
2					
2,1					
2,2					
2,3					
2,4					

J'ai opéré de la manière suivante. A 1 c. c. d'acide phosphorique déci-normal, j'ajoutais des quantités de soude déci-normale variant de 0 c. c. 9 à 2 c. c. 4. J'ajoutais ensuite des quantités d'eau distillée suffisantes pour amener tous les liquides au même volume de 8 c. c. Dans chacun des liquides obtenus on mettait une goutte du réactif colorant et l'on faisait ainsi des séries de tubes que l'on comparait. On a noté comme repères les points de virage du méthylorange et de la phénolphta-

léine qui, comme on le sait, sont très nets dans les mélanges d'acide phosphorique et de soude, et correspondent précisément aux deux ressauts indiqués de l'acidité, c'est-à-dire à la présence de 1 ou 2 molécules-grammes de soude dans le liquide pour 1 d'acide phosphorique.

Ce sont toujours des teintes de cette zone sensible comprise entre l'alcalinité du biphosphate et l'acidité du monophosphate de sodium que les auteurs ont observées dans les vacuoles digestives des amibes. Nous rappelons que c'est précisément dans cette zone, et plutôt dans la moitié inférieure (alcaline) que se manifeste la digestion des matières protéiques par notre amibodiastase. Nous nous croyons donc autorisé à conclure que ses propriétés sont celles de la diastase intracellulaire et qu'elle lui est identique à l'activité près.

XI

COMPARAISON DE L'AMIBODIASTASE AVEC LES AUTRES DIASTASES INTRACELLULAIRES

La première diastase à laquelle il convient de comparer l'amibodiastase est certainement la diastase liquéfiant la gélatine que Beyerinck a vue excrétée par son *A. zymophila*. Nous avons dit que cette diastase, que l'auteur n'a d'ailleurs pas obtenue en assez grande quantité pour opérer *in vitro*, liquéfie de préférence la gélatine lorsque le microbe qui accompagne la levure ne secrète pas d'acide, d'où il conclut que cette diastase est une trypsine. Il est à supposer, avec l'auteur, que cette diastase est versée dans le milieu extérieur lorsque les vacuoles digestives sont expulsées, ce qui la ferait tout à fait analogue à notre amibodiastase. Pour s'assurer si sa trypsine n'est pas accompagnée de sucrase ou d'amylase, Beyerinck emploie ce procédé très ingénieux d'essayer de cultiver dans le milieu où vit l'amibe un microbe (mycoderme) qui a besoin de glucose et ne secrète ni sucrase ni amylase. En introduisant dans la culture pour tout aliment hydrocarboné du sucre de canne ou de l'amidon, on connaît par le développement ou le non-développement de ce microbe si

l'amibe lui a préparé l'aliment nécessaire. Or, il n'en est rien. Comme notre amibodiastase, la diastase de Beyerinck ne contient donc sensiblement qu'un ferment trypsique.

On sait qu'aucune diastase n'a été jusqu'à ce jour isolée des Infusoires ciliés pour les mêmes raisons qui en rendent l'extraction chez les amibes fort laborieuse. Je rappellerai seulement que les observations microscopiques la font très proche parente de la diastase des amibes. Comme elle, elle paraît surtout être protéolytique, puisque ce n'est qu'exceptionnellement qu'on a pu voir des grains d'amidon attaqués chez les ciliés. Encore n'étaient-ils pas dissous ou seulement très peu, mais transformés en une matière qui devenait rouge brun par l'iode. Les réactifs colorants indiquent dans les vacuoles une acidité semblable à celle qu'on voit chez les amibes, parfois un peu plus forte puisqu'il arrive assez fréquemment que le tournesol vire au rouge franc, l'alizarine au jaune.

Chez les Eponges, une extraction de la diastase n'a été faite que par Krukenberg. Il a conclu successivement à l'existence chez ces êtres d'une diastase pepsique, puis trypsique. Mais ces résultats semblent douteux et auraient besoin d'être confirmés. Récemment, Cotte¹ a confirmé l'existence d'une trypsine des éponges, mais ces résultats mériteraient aussi d'être précisés. Krukenberg a aussi extrait d'un plasmode de Myxomycète (*Aethalium septicum*) une diastase qu'il dit pepsique.

En revanche, chez les Actinies, Mesnil, dans un travail récent déjà cité, a montré l'existence d'une diastase digestive intracellulaire à la fois protéolytique (trypsique), et aussi présurante, lipasique et faiblement amylolytique. Au point de vue de la réaction des vacuoles, les réactifs colorants indiquent encore ici une acidité plus grande que celle du milieu extérieur, mais faible et ne dépassant pas celle du monophosphate de sodium : le rouge neutre prend une teinte rouge vif dans les vacuoles des cellules des filaments mésentériques et le tournesol communique aux mêmes tissus une couleur lilas. Ces indications concordent bien avec celles que fournit l'étude *in vitro* de la zone d'activité de la diastase.

Les indications fournies par les réactifs colorants (tournesol et rouge neutre) chez les Turbellariés, dont on n'a pas encore tenté

1. COTTE, Notes sur le *Suberites domuncula*, thèse de médecine, Paris (1901).

d'extraire de diastases, assignent à leur protéase une zone d'action placée assez bas dans le tableau établi ci-dessus¹.

Quant aux leucocytes des Mammifères, dans lesquels plusieurs travaux ont démontré la présence de l'amylase², on sait peu de choses de leurs protéases. D'un pus de l'hypopion qu'il a vérifié stérile, Leber³ a pu faire un extrait qui digérait la fibrine coagulée à 25° et liquéfiait la gélatine. Des leucocytes du pus également, Achalme⁴ a extrait un liquide doué de plusieurs propriétés diastasiques différentes. Avant tout, ce liquide est protéolytique et digère les différents albuminoïdes en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide au tournesol, c'est-à-dire qu'il est encore trypsique. Il présente cette particularité curieuse de ne digérer la gélatine qu'en milieu salin.

Si nous comparons aux deux types classiques de la pepsine et de la trypsine des Vertébrés supérieurs toutes celles des diastases intracellulaires que l'on connaît bien, nous sommes amenés à conclure qu'elles se rattachent toutes au type trypsique, c'est-à-dire qu'elles digèrent en milieu alcalin, neutre ou faiblement acide et poussent assez loin la désagrégation de la molécule albuminoïde, jusqu'à des corps cristallisés tels que la tyrosine. Notre amibodiastase n'échappe pas à cette règle.

Les indications que donnent les virages des réactifs colorés placent d'ailleurs dans la même zone de réaction l'activité des diastases intracellulaires que l'on n'a pas aussi bien étudiées.

Au reste, le type trypsique semble être très répandu dans les deux règnes de la nature. En dehors de la trypsine des vertébrés supérieurs, on rencontre des protéases de ce type dans des groupes d'animaux très divers : Annélides (lombric et *Nereis*), Crustacés (écrevisse), Insectes et Arachnides, etc.⁵, et aussi chez des végétaux (latex du *carica papaya*, du figuier, jus de l'ananas, *Aspergillus niger*, etc...) A coup sûr, ces diastases présentent entre elles des différences notables. Les unes ont leur optimum

1. Metchnikoff et Mesnil ont vu que le virage du tournesol dans les vacuoles digestives est exceptionnel; en revanche, Metchnikoff a observé le virage du rouge neutre.

2. Voir METCHNIKOFF, *L'Immunité dans les maladies infectieuses*, Paris (1904), p. 402.

3. LEBER, *Die Entstehung der Entzündung*. Leipzig (1894), p. 508.

4. ACHALME, *C. R. Soc. Biol.* (1899), p. 568.

5. Pour la bibliographie des diastases digestives, voir RICHET, *Dict. de physiologie*. Article : digestion (Hédon).

d'action pour une réaction un peu plus acide, les autres pour une réaction plus alcaline. Il en est, comme l'endotrypsine des levures de Hahn et Geret¹, qui, aux dépens des matières albuminoïdes, donnent bien de la leucine et de la tyrosine, mais pas de peptones, alors que les autres en produisent.

Plus les études sur ce sujet deviendront nombreuses, plus il apparaîtra certainement qu'il existe des variétés de protéases différentes par les conditions ou par les produits de leur action. Il n'en est pas moins vrai qu'elles se groupent bien sous les deux rubriques classiques et que, dans la nature, les trypsines semblent être de beaucoup les plus répandues. Les diastases pepsiques, au contraire, digérant en milieu fortement acide et ne poussant pas la simplification de la molécule albuminoïde au-delà des peptones, peuvent être considérées comme exceptionnelles.

CONCLUSIONS

Je résume les résultats obtenus dans ce travail :

J'ai isolé du sol une espèce d'amibes que j'ai cultivée sur des milieux solides et j'ai étudié son mode de développement dans ces cultures (multiplication et enkystement).

J'ai donné un procédé pour isoler cette amibe en présence d'une seule espèce bactérienne, qu'on peut d'ailleurs faire varier.

Cette amibe agglutine les microbes (*B. coli*) dont elle est nourrie, grâce à la sécrétion de la vacuole pulsatile. J'ai insisté sur l'intérêt de ce phénomène.

Le rouge neutre m'a permis de suivre au microscope l'acidification progressive des vacuoles.

Des colorations faites après fixation ont montré à l'intérieur de ces vacuoles les modifications que subissent les microbes ingérés.

J'ai étudié la pénétration par osmose dans l'amibe de quelques matières colorantes et leur fixation sur le noyau. J'ai montré aussi que le protoplasme des amibes (au moins à l'état de kystes) n'est pas facilement perméable aux solutions salines puisqu'il

1. HAHN et GERET, *Zeitschr. f. Biologie* (1900), t. XL, p. 113.

se comporte vis-à-vis d'elles comme une membrane semi-perméable et permet de mesurer correctement l'isotonie des solutions.

Enfin j'ai extrait des amibes cultivées une diastase surtout protéolytique qui se rapproche de la trypsine, tant par sa réaction *optima* que par les produits de son activité. J'ai d'ailleurs établi par des expériences de comparaison que le microbe qui l'accompagne dans les cultures (*B. coli*) n'est pour rien dans la production de cette diastase.

Comparant les résultats de ces expériences *in vitro* avec les observations faites *in vivo*, j'ai été amené à conclure que la protéase extraite des amibes est bien celle qui agit à l'intérieur de leurs vacuoles digestives.

La longueur des manipulations nécessaires pour se procurer une quantité peu considérable de diastase explique que je n'aie encore pu suivre dans tous ses détails l'action de cette substance. J'espère toutefois avoir apporté une contribution utile à l'histoire encore peu connue des diastases intracellulaires.

Que mes anciens maîtres qui m'ont ouvert leurs laboratoires, MM. Ed. Perrier et Costantin, veuillent bien recevoir ici mes plus sincères remerciements. MM. Duclaux, Roux et Metchnikoff m'ont accueilli à l'Institut Pasteur et m'ont souvent soutenu de leurs encouragements et aidé de leurs conseils. Qu'ils me permettent de leur en témoigner ma profonde reconnaissance. M. le docteur Borrel a bien voulu exécuter les dessins qui accompagnent ce mémoire; M. Delezenne m'a souvent donné au cours des expériences de très utiles indications; M. Mesnil m'a fait profiter de l'expérience que lui a donné un travail récent sur un sujet voisin. Je suis heureux de pouvoir ici les en remercier tous trois.

EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

Lettres communes à toutes les figures : *n*, noyau; *k*, karyosome du noyau; *ect*, ectoplasme; *end*, endoplasme; *vd*, vacuole digestive; *vc*, vacuole contractile; *m*, membrane du kyste.

Fig. 1. — Amas de kystes d'amibes dans une culture sur gélose de 10 jours.

Fig. 2. — Groupes de kystes de l'amas précédent pour montrer l'aspect polygonal du contour des kystes pressés les uns contre les autres. Gr. = 650 env.

Fig. 3. — Kyste isolé coloré par le rouge de ruthénium. Gr. = 650.

Fig. 4. — Kyste plasmolysé par une solution de sel marin.

Fig. 5. — Amibe nourrie de *B. coli* et plongée dans une solution faible de *neutralroth*. Les microbes, dans plusieurs vacuoles digestives, sont colorés par le rouge (a). Au voisinage de la vacuole pulsatile s'est formé un amas de microbes agglutinés. Gr. = 1,000 env.

Fig. 6. — Amibes mobiles nourries de *B. coli* dans une solution faible (2/1000) de rouge de ruthénium. La couleur n'a pas encore pénétré les amibes; les microbes libres dans le liquide et ceux qui sont agglutinés au voisinage de la vacuole pulsatile ont pris la couleur. Gr. = 850 env.

Fig. 7. — Amibe colorée vivante par le bleu de méthylène. La teinte a dû être changée dans la figure. Le karyosome doit être bleu pâle, les microbes se teignent en bleu foncé. Gr. = 1,100.

Fig. 8. — Amibe colorée sans fixation par le rouge de ruthénium.

Fig. 9. — Amibes colorées après fixation (alcool : 10 minutes) par la méthode de Laveran. Dans 9 a, on voit plusieurs vacuoles digestives contenant des microbes (staphylocoques) à différents états de digestion de plus en plus avancés (dans l'ordre 1, 2, 3). Dans 9 b, on voit bien l'aspect que prend ordinairement le noyau par cette coloration. Gr. = 1,100.

Fig. 10. — Une colonie microbienne dans une culture où l'on aensemencé des amibes en un point extérieur à cette colonie. Les amibes ont atteint la colonie et ont semé en tous sens autour d'elle un grand nombre de colonies secondaires.

ACTION DU SÉRUM SANGUIN

SUR LES PARAMÉCIES

PAR LE D^r LEDOUX-LEBARD

(Travail du laboratoire de M. le D^r Roux.)

Les infusoires se prêtent bien à l'étude des substances toxiques pour leur organisme. Beaucoup d'entre eux sont visibles à de faibles grossissements. Ils sont mobiles et l'altération de leur motilité devient un signe, facile à observer, de l'influence du poison. Celui-ci, chez les infusoires très différenciés, peut agir, en outre, sur les différents organes : vésicules contractiles, portion mobile de l'endosarc, couche à trichocystes, cils vibratiles dont il modifie la forme ou le fonctionnement.

Nous étudierons, dans ce mémoire, l'action sur les paramécies du sérum sanguin de quelques espèces animales.

Raab ¹ a constaté que des paramécies qu'il avait mises dans du sérum humain, dans le but de rechercher l'action de la fluorescence, sont mortes en 15 minutes, et en 30 minutes lorsque ce sérum était mélangé d'eau, à parties égales. Il ne put démontrer aucune action de la lumière et conclut que la substance qui, dans le sérum, tue les paramécies est inconnue. Faisons observer que l'eau physiologique tue également les paramécies dont le contenu est isotonique, d'après Balbiani ² avec une solution de chlorure de sodium à 0,30 pour 100. Il faut donc employer le sérum en dilution étendue, lorsqu'on veut étudier son pouvoir toxique sur ces infusoires.

M^{me} Metchnikoff ³ a essayé l'action, sur les paramécies, du sérum d'anguille. « Celui-ci n'a point manifesté de pouvoir toxique supérieur à celui du sérum sanguin d'autres animaux ».

1. *Zeitschr. f. Biolog.*, XXIX Bd, 4 Heft, 1900.

2. *Arch. d'Anat. microscop.*, 1898, p. 547.

3. Citée dans *l'Immunité dans les maladies infectieuses*, par E. Metchnikoff, p. 22.

Les paramécies dont nous nous sommes servi pour nos expériences appartenaient à l'espèce *P. caudatum*. Elles étaient cultivées suivant le procédé indiqué par Balbiani ¹. Autant que possible, on n'utilisait que les cultures contenant de 500 à 1,000 paramécies par centimètre cube.

La technique est simple : on prépare dans un verre de montre un mélange d'eau et de sérum et l'on ajoute la culture de paramécies. Ces liquides sont dosés exactement, avec une pipette graduée en dixièmes de centimètre cube. Le volume total du liquide ne doit pas dépasser 2 c. c. à 2 c. c. 5, pour être facilement explorable. Le verre de montre est placé dans une chambre humide.

Études d'abord l'action du sérum de cobaye qui reproduit, avec des différences en plus ou en moins, l'ensemble des effets obtenus avec les autres sérums.

On prépare une dilution n° 1 de sérum de cobaye, à 1/20 dec. c. de sérum pour 1 c. c. du mélange.

N° 1.	
Eau.....	18/10 c. c.
Sérum de cobaye.....	1/10 c. c.
Culture.....	1/10 c. c.

Les paramécies nagent d'abord avec agilité ; au bout de 10 à 30 minutes, leurs mouvements se ralentissent, un grand nombre tombent au fond du liquide tandis que d'autres continuent à nager. Bientôt, toutes sont au fond, immobilisées avec des mouvements sur place ou progressant lentement.

Pendant cette phase de ralentissement et d'immobilisation apparaît, à l'extrémité postérieure de chaque paramécie, une masse floconneuse, irrégulière, de forme variable, très petite d'abord, augmentant peu à peu de volume et acquérant des dimensions qui peuvent atteindre environ le tiers du volume de l'infusoire. Celui-ci traine cette masse dont il parvient quelquefois à se débarrasser, soit par une nage plus rapide, soit par des mouvements alternatifs de progression et de recul ; ou bien la masse se fragmente, des portions se détachent et le fardeau est ainsi allégé, mais seulement pour quelques instants, car il ne tarde pas à s'accroître d'un nouvel apport de matières. La masse est visqueuse ; pendant la progression, elle s'étire sou-

1. Loc. cit.

vent en un long filament qui semble partir de l'extrémité postérieure de la paramécie; l'autre bout est libre ou relié au gros de la masse, ou bien encore celle-ci se fractionne en renflements successifs. Cette disposition en chapelet aide à découvrir des filaments qui, par leur ténuité, et leur transparence pourraient échapper à l'observation.

Nous reviendrons, dans un instant, sur l'origine et la composition de ces masses adhérentes. Continuons maintenant l'observation des paramécies gênées dans leurs mouvements par de telles entraves, affaiblies ou paralysées par suite de l'action du sérum.

Elles nagent de plus en plus lentement au fond du liquide. Deux d'entre elles se rencontrent. Leurs extrémités antérieures se dégagent encore assez bien des masses visqueuses, mais lorsque celles-ci se mettent en contact, elles s'accolent en une masse unique qui lie les paramécies l'une à l'autre par leurs extrémités postérieures. Elles tirent, chacune de leur côté, en ligne droite et en sens opposé. Cédant à cette traction, le lien s'allonge et se rompt quelquefois, libérant les paramécies. Le plus souvent, elles restent unies. D'autres surviennent et se laissent prendre de même par leurs masses visqueuses. Ainsi se forment des agglomérations étoilées ou rayonnantes de 3, 4 ou d'un plus grand nombre de paramécies. Celles-ci sont disposées comme les rayons d'une sphère, les extrémités antérieures libres, à la périphérie, les extrémités postérieures réunies au centre par les masses visqueuses confluentes. C'est une disposition analogue à celle des agglomérations en rosace des trypanosomes, décrites par Laveran et Mesnil ¹.

Les agglomérations nombreuses offrent une disposition plus ou moins irrégulière. D'ailleurs, l'agglutination entre paramécies se complique de l'agglutination avec des corps étrangers qui peuvent se trouver dans la préparation; dépôts de la culture, brins de coton, etc. Ces corps tenus s'attachent aux masses visqueuses et sont entraînés par la paramécie, lorsqu'elle possède encore assez de vigueur. Si le poids est trop lourd, ou la force épuisée, c'est la paramécie qui reste attachée au corps étranger. Il est fréquent de voir des fragments de fibres végétales auxquels plusieurs paramécies sont appendues par leurs

1. Ces *Annales*, 1901, n° 9, et 1902, n° 1.

extrémités postérieures, au moyen des masses adhérentes, comme les fruits d'une grappe à leur axe.

Au terme de cette période d'agglutination commencée vers la fin de la première heure, achevée dans la deuxième ou troisième heure, plus tôt ou plus tard suivant l'activité du sérum, l'aspect de la préparation est bien différent de celui de la période précédente. Plus de paramécies nombreuses nageant rapidement dans les diverses couches du liquide comme au début, ou lentement au fond, mais seulement des paramécies agglutinées en agglomérations rayonnantes ou irrégulières, d'autres attachées à de petits corps étrangers, quelques-unes seulement ayant échappé à l'agglutination, toutes gisant inertes au fond du liquide.

Les paramécies n'ont pas encore cessé de vivre. A de forts grossissements on constate des mouvements de rotation autour du grand axe ou de faibles déplacements. Les vésicules pulsátiles se contractent, bien que plus rarement, la cyclose de l'endosarc persiste, les cils vibratiles continuent leurs oscillations. Bientôt, les vésicules contractiles se paralysent, elles présentent une dilatation considérable souvent limitée à l'une d'elles, tout mouvement cesse, le corps se déforme et devient ovoïde.

Au bout de 24 heures, les 50 ou 60 paramécies contenues dans la préparation sont presque toutes mortes. Quelques-unes seulement ont résisté, sans avoir acquis, pour cela, l'immunité contre l'action d'une nouvelle dilution de sérum à 1/20.

Pour avoir une notion plus précise de l'activité du sérum de cobaye, on a préparé en même temps que la dilution n° 1 d'autres dilutions n° 2, n° 3, n° 4, n° 5. Elles diffèrent de la dilution n° 1 seulement en ce que, au lieu de 1/10 c. c. de sérum, on a mis dans n° 2, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 2; dans n° 3, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 4; dans n° 4, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 8; dans n° 5, 1/10 c. c. de sérum dilué à 1 : 16. Le volume du liquide étant 2 c. c., on voit que ces dilutions contiennent respectivement, par centimètre cube : n° 1, 1/20 c. c.; n° 2, 1/40 c. e.; n° 3, 1/80 c. c.; n° 4, 1/160 c. c.; n° 5, 1/320 c. c. de sérum.

Le ralentissement, l'immobilisation des paramécies, l'expulsion de masses adhérentes, l'agglutination peuvent s'observer dans les dilutions n° 1, n° 2, n° 3, n° 4. Les phénomènes tardent

d'autant plus à apparaître et à se généraliser à toutes les paramécies que la dilution est plus étendue. Dans le liquide n° 5, on remarque au bout de quelques heures une rapidité un peu moindre des mouvements, et quelques paramécies expulsent des masses visqueuses d'un faible volume. L'action du sérum est donc encore sensible dans la dilution de 1 : 320. Après 24 heures, on trouve des paramécies mortes et d'autres immobiles, dans les dilutions 2, 3; la mobilité reste diminuée dans la dilution 4, elle est redevenue normale dans la dilution 5; les paramécies agglutinées qui restent vivantes se désagrègent.

Le phénomène de l'expulsion des masses adhérentes exige une étude complémentaire. Ces masses, après leur expulsion, s'attachent à la région postérieure de l'infusoire, par l'intermédiaire des cils vibratiles altérés par le sérum. L'adhérence est souvent limitée à la touffe de cils qui recouvre l'extrémité postérieure. Grâce à des examens répétés, on découvre des paramécies munies de masses étirées en filaments et pour lesquelles cette adhérence aux cils postérieurs ne s'est pas encore établie. Lorsqu'elles nagent en zigzag, on observe, en effet, que le filament ne s'attache pas à l'extrémité postérieure à laquelle il s'applique seulement pendant la progression rectiligne, mais dont il s'écarte au moment des changements de direction. Il s'insère en réalité en avant de cette extrémité, et sous une zone transversale qui est celle assignée à l'anus, sans que nous ayons pu arriver à une détermination plus précise. C'est par cet orifice, croyons-nous, que la masse est expulsée. Notre opinion s'appuie sur les faits que nous allons exposer.

La masse éliminée, lorsqu'elle a acquis un certain volume, s'étale à l'extrémité postérieure de la paramécie, et par suite de ses adhérences aux cils, pendant les mouvements de l'infusoire, elle s'étend plus ou moins vers la région antérieure. Elle s'applique, par sa surface adhérente, à la cuticule dont elle est séparée par une ligne claire répondant au revêtement ciliaire. La surface libre est irrégulière et, lorsque l'expulsion est récente, formée de petites bosselures assez égales dont la présence est liée au mode de formation de la masse. Celle-ci se composait, pour nos paramécies, de petits bâtonnets de 3 μ de longueur formées d'une portion axiale plus réfringente entourée d'une

zone claire. Ces bâtonnets étaient semblables, par leur forme et leur colorabilité, à ceux qui composaient les bols alimentaires circulant dans l'endosarc. Ces bacilles représentaient sans doute l'aliment de choix des paramécies, parmi les microbes qui pullulaient dans la macération de mâche servant de bouillon de culture. Après leur expulsion, ces bols alimentaires incomplètement digérés conservaient plus ou moins longtemps leur forme sphérique et donnaient à la masse adhérente, qui est une masse fécale, son aspect muriforme.

Microbes encore entassés en boule, microbes dissociés sont unis par une substance visqueuse qui nous paraît devoir provenir des vacuoles digestives. Nous ignorons s'il faut y ajouter une portion de la substance sarcodique; mais nous n'avons pas trouvé dans les matières éliminées de cristaux semblables à ceux qui circulent dans l'endosarc. Enfin, on observe des amas de trichocystes à l'état de spicules intriqués en tous sens et situés à la périphérie ou çà et là, dans l'intérieur des masses adhérentes. Nous avons assisté à une décharge de trichocystes par une paramécie placée dans une dilution de sérum de rat; il existait une masse adhérente qui fut repoussée à quelque distance.

Tous ces caractères ne s'appliquent qu'aux masses récentes qui viennent d'être éliminées, ils disparaissent en peu de temps parce que les masses se déforment, s'altèrent et perdent leur transparence. Les précipités qui se produisent fréquemment dans les dilutions de sérum peuvent former ainsi, à la surface des paramécies, des dépôts adhérents qu'explique l'altération des cils. Ces dépôts se distinguent des masses que nous venons de décrire par leur opacité, leur composition différente, leur siège dans n'importe quelle région du corps de l'infusoire. Lorsqu'ils occupent un seul côté, ils provoquent des mouvements de rotation uniforme.

L'agglutination des paramécies s'effectue donc par l'intermédiaire de masses visqueuses composées presque en totalité de fèces. Il faut, pour qu'il y ait agglutination, que les matières éliminées aient d'elles-mêmes ou acquièrent, au contact du sérum, le degré de viscosité nécessaire.

L'expulsion de matières se distinguant, par leur abondance, de la défécation normale, peut s'observer, sans qu'il y ait agglu-

tion. Ce qui est particulier ici, c'est la propriété qu'ont les masses expulsées d'adhérer à la fois entre elles et aux paramécies.

Dans une dilution de sérum de rat à $3/20$ et aussi à $1/10$, nous avons vu les paramécies immobilisées en quelques minutes. Les masses expulsées étaient abondantes, et néanmoins il n'y avait pas d'agglutination, alors qu'elle se produisait dans la dilution du même sérum à $1/40$. Le défaut d'agglutination n'était pas attribuable à ce que les paramécies eussent conservé assez de force pour rompre les masses visqueuses par leurs tractions. La diminution de la mobilité était au contraire plus marquée dans les dilutions à $3/20$ et à $1/10$ que dans celle à $1/40$ où l'agglutination existait. D'autre part, il était difficile d'invoquer une insuffisance de la mobilité qui, supprimant les contacts, eût empêché l'agglutination, car celle-ci ne s'est pas produite dans une préparation semblable, malgré l'agitation du liquide.

Il y a donc, outre la composition qualitative de la dilution de sérum, des conditions tenant à la proportion des corps en présence, qui favorisent ou empêchent l'agglutination. Une dose trop forte de sérum supprime le phénomène.

Enfin, en supposant ces conditions remplies : viscosité des masses expulsées les faisant adhérer entre elles et aux paramécies ; viscosité supérieure à la force des paramécies ; l'agglutination se produira-t-elle nécessairement ? Les chances de rencontre des paramécies se mouvant avec lenteur au fond du liquide, sont-elles assez grandes pour réaliser l'agglutination possible, ou faut-il encore supposer une attraction réciproque de ces infusoires ? C'est ce que l'observation ne permet pas de décider.

Les détails qui précèdent nous permettent de résumer très brièvement les résultats obtenus avec d'autres sérums. Comme précédemment, les nombres indiquant les titres des dilutions, donnent en centimètres cubes, le volume du sérum contenu dans 1 c. c. de la dilution. Le mot : immobilisation, signifie que les paramécies, au lieu de nager dans les diverses couches du liquide, sont tombées au fond et ne progressent plus que lentement ou sont tout à fait immobiles.

Sérum de lapin. *Sérum de chèvre* (un seul essai). — Les sérums à 1/20 ont agi sur les paramécies comme le sérum de cobaye. Mais, pour le sérum de lapin, plus faiblement.

Sérum de cheval. — A 1/20, produit en 2 heures l'immobilisation et l'expulsion de masses fécales. Nous n'avons pas constaté d'agglutination dans les dilutions à 1/20, à 1/10.

Sérum de mouton (un seul essai). — Agglutination faible, en 2 heures, dans la dilution à 1/20. Déformation des paramécies. Mort.

Sérum de bœuf. — Ce sérum est très actif. A 1/20 : immobilisation des paramécies en 15 minutes, expulsion de masses adhérentes, faible agglutination, dilatation excessive des vésicules. Mort en quelques heures.

A 1/40 : immobilisation en 20 minutes suivie d'agglutination.

A 1/200 : immobilisation en 30 minutes, agglutination, mort.

A 1/320 : immobilisation, légère agglutination.

Le sérum de veau (un seul essai) s'est comporté comme celui de bœuf.

Sérum de rat blanc. — Très toxique. A 1/20, 1/40 : immobilisation, expulsion des masses adhérentes, agglutination, dans un intervalle de 20 minutes à 1 heure. Mort des paramécies.

A 1/30, 1/160, mêmes phénomènes, mais un certain nombre des paramécies survivent.

A 1/320, le pouvoir toxique s'est encore manifesté par un ralentissement marqué des mouvements.

Sérum de pigeon (un seul essai). — A 1/20 : immobilisation au commencement de la 2^e heure. Expulsion des masses adhérentes. Faible agglutination.

Sérum d'oie (un seul essai). — A 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 : immobilisation au bout de 1 à 4 heures, d'autant plus rapide que la dilution est plus forte. Expulsion de masses adhérentes. Au bout de 24 heures, survie d'un certain nombre de paramécies qui ont recouvré leur mobilité.

Sérum humain. — Nous avons examiné 28 échantillons de sérum humain provenant des services hospitaliers de MM. les docteurs Letulle et Doléris à qui nous exprimons nos bien vifs remerciements. Le sang a été obtenu, soit par l'application de ventouses scarifiées (14 cas) sur des malades atteints d'affections

très diverses, soit par la section du cordon ombilical (14 cas), immédiatement après l'accouchement.

Dans les 14 derniers cas, le sérum s'est montré 10 fois très peu actif dans les dilutions à 1/20 où il ne produisait qu'un peu de ralentissement, quelquefois à peine appréciable, des mouvements, 4 fois actif pour la même dilution. (Immobilisation. Mort des paramécies ou d'un grand nombre d'entre elles au bout de 24 heures.)

Dans la dilution à 1/10, 4 fois sur 5 essais, le sérum était toxique.

Sur les 14 échantillons de sérums pathologiques, 6 fois le sérum s'est montré inactif ou à peu près inactif et 8 fois actif dans la dilution à 1/20.

Cette variabilité du pouvoir toxique n'est point particulière au sérum humain. Nous l'avons constatée pour les sérums de cobaye, de rat, de cheval. Nous sommes porté à croire, d'après nos observations, que lorsqu'il s'agit de sérums normaux, le pouvoir toxique varie, pour une espèce animale, entre des limites assez rapprochées. Parmi les sérums que nous avons étudiés, ceux de bœuf, de rat, d'oie sont les plus toxiques, le sérum humain est celui qui l'est le moins.

Le sérum de cobaye chauffé à 55° pendant une demi-heure perd son pouvoir d'immobiliser et d'agglutiner les paramécies. Déjà, après 10 minutes de chauffage à cette température, ce sérum ne produit plus qu'un ralentissement des mouvements dans les dilutions à 1/20.

A 55°, le sérum de lapin est modifié comme celui de cobaye.

Le pouvoir agglutinant des sérums de cobaye et de lapin, aboli à 55°, se distingue, par cette faible résistance à la chaleur, de la propriété analogue des sérums antimicrobiens; ceux-ci restent agglomérants après le chauffage à 55°.

Le sérum de bœuf, qui est très toxique, conserve encore, lorsqu'il a été soumis à la température de 55°, pendant une demi-heure, une toxicité qui ne disparaît à peu près complètement que par le chauffage à 60° pendant une demi-heure. Pour le constater, on prépare des dilutions à titres croissants, à 1/20, 2/20, 3/20, avec le sérum chauffé à 55° et aussi avec le sérum de bœuf chauffé à 60°. La comparaison des dilutions de

même titre démontre l'influence de la température; celle des dilutions de titres différents permet d'apprécier la toxicité. Or, les paramécies sont plus ou moins complètement immobilisées dans les dilutions de sérum chauffé à 55°; la mobilité persiste dans les dilutions de sérum chauffé à 60°, mais est diminuée dans les deux plus fortes; à 2/20 et 3/20.

La même expérience répétée avec le sérum de cheval et avec celui de cobaye démontre que le premier conserve une légère toxicité après le chauffage à 55°, qui suffit au contraire à supprimer le pouvoir toxique du sérum de cobaye, dans les dilutions à 1/20, 2/20, 3/20.

La persistance du pouvoir toxique dans certains sérums après le chauffage à 55° n'est pas en contradiction avec ce que nous savons sur les propriétés des sérums hémolytiques. Lorsqu'on chauffe à 55° un sérum hémolytique pour une espèce d'hématies, ce sérum exerce encore une action sur les cellules; mais à défaut de l'hémolyse qui est le signe utilisé avec le réactif globule rouge, cette action reste latente. La moindre atteinte portée à l'organisme de la paramécie retentit sur la motilité dont l'altération décèle la faible toxicité de certains sérums chauffés. Les choses se passent comme s'il y avait dans ces sérums soit plusieurs substances toxiques destructibles à différentes températures, soit une seule substance toxique donnant, à partir de 55°, des dérivés de toxicité décroissante.

La suppression du pouvoir toxique du sérum sous l'influence de la chaleur conduit à rechercher s'il est possible de faire réapparaître la toxicité, par l'addition au sérum chauffé, d'un autre sérum inactif ou peu actif. Ce dernier est représenté dans l'expérience suivante par un sérum humain inactif à 1 : 20. Le sérum inactivé par le chauffage était du sérum de cobaye porté à 55° pendant une demi-heure.

On prépare les trois dilutions :

N° 1.

Eau	17/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye.....	1/10 c. c.
Sérum humain	1/10 c. c.
Culture de param.....	1/10 c. c.

N° 2.	
Eau.....	16/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye.....	2/10 c. c.
Sérum humain.....	1/10 c. c.
Culture de param.....	1/10 c. c.

N° 3.	
Eau.....	15/10 c. c.
Sérum chauffé de cobaye.....	3/10 c. c.
Sérum humain.....	1/10 c. c.
Culture de param.....	1/10 c. c.

On prépare aussi trois dilutions témoins n° 4, n° 5, n° 6 qui diffèrent de n° 1, n° 2, n° 3, en ce que le sérum humain y est remplacé par la même quantité du même sérum humain chauffé une demi-heure à 55°.

Enfin, une dilution n° 7 est ainsi composée :

Eau.....	18/10 c. c.
Sérum humain.....	1/10 c. c.
Culture de param.....	1/10 c. c.

Voici les résultats observés. Dans les dilutions n° 1, n° 2, n° 3 se produisent, en 3 heures, l'immobilisation avec expulsion de masses adhérentes, l'agglutination des paramécies. C'est dans n° 3 que les phénomènes apparaissent d'abord, puis dans n° 2 et n° 1.

La mobilité des paramécies persiste dans les dilutions témoins n° 4, n° 5, n° 6. Mais on note l'expulsion de masses non adhérentes. Elle persiste également dans la dilution n° 7.

Au bout de 24 heures, toutes les paramécies sont mortes ou encore absolument immobilisées dans n° 1, n° 2, n° 3; elles nagent dans n° 4, n° 5, n° 6, aussi bien que dans n° 7.

Cette expérience ne donne pas la preuve décisive que le sérum chauffé ait été réactivé par le sérum humain. Une autre interprétation est permise. Le sérum humain, bien que non toxique aux doses employées, est plutôt nuisible aux paramécies; le sérum chauffé agit peut-être dans le même sens; ces deux effets, tolérés séparément, peuvent en s'ajoutant l'un à l'autre produire les phénomènes observés.

Nous avons recherché si les paramécies traitées par un sérum chauffé sont devenues plus sensibles à l'action d'une dilution de sérum humain à 1/20 non toxique pour des paramécies neuves.

Après plusieurs essais, nous avons adopté le procédé suivant qui permet de réaliser simplement l'expérience. Des paramécies

sont laissées dans le sérum chauffé de cobaye et dilué à $1/5$, pendant environ 1 h. 20 dans une expérience, pendant 2 jours dans une seconde expérience. On transporte ensuite chaque paramécie séparément, au moyen d'une effilure de pipette, dans un verre de montre distinct contenant une dilution de sérum humain à $1/20$. Or, les paramécies traitées par le sérum de cobaye ont conservé leur mobilité normale dans cette dilution, aussi bien que des paramécies neuves.

Ce fait négatif justifie les réserves que nous exprimions au sujet de l'interprétation à donner à l'expérience précédente sur le pouvoir toxique du mélange de sérum chauffé et de sérum humain. De nouvelles recherches sont nécessaires pour savoir si l'action du sérum sur les paramécies est comparable à celle d'un sérum hémolytique sur les hématies.

RECHERCHES
SUR LE
MODE DE RÉSORPTION DES CELLULES HÉPATIQUES
INJECTÉES DANS L'ORGANISME

PAR LE D^r J. CANTACUZÈNE

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Avec les planches VIII et IX.

I

Le problème de la résorption des cellules dans l'organisme sain ou malade préoccupe depuis longtemps les biologistes et l'on connaît déjà le mécanisme suivant lequel disparaissent un grand nombre d'organes larvaires, de cellules affaiblies par l'usure vitale ou de produits pathologiques; les travaux classiques de Kowalewsky, v. Rees, Metchnikoff nous ont appris que l'histolyse larvaire chez les insectes, la résorption de la corde dorsale chez les tuniciers ou celle de la queue chez les batraciens anoures sont l'œuvre de phagocytes d'origine mésodermique. Dans la rate, les ganglions, les capillaires du foie, chez les vertébrés supérieurs, les leucocytes mononucléaires (macrophages) détruisent journellement une quantité considérable d'hématies ou de leucocytes qu'ils englobent et digèrent; les mêmes éléments sont les agents de la résorption ovulaire, ainsi qu'il résulte des recherches d'Henneguy et de plusieurs autres auteurs, entre autres de Matchinsky¹ qui a publié récemment un travail soigné sur cette question; dans un grand nombre de cas pathologiques, les cellules de notre organisme deviennent la proie des phagocytes : ainsi disparaissent les fibres nerveuses, les fibres musculaires, les cellules nerveuses ou les agrégats cellulaires de nouvelle formation (cellules géantes, etc.) qui subissent la transformation dite fibreuse. Les scléroses de tout ordre, qu'il s'agisse de celles qui s'installent à la suite d'intoxications

¹ *Ann. Inst. Pasteur*, 1901.

fortuites ou qu'ils s'agisse de scléroses séniles, nous apparaissent également aujourd'hui comme le reliquat de la lutte qui s'établit entre certaines cellules de l'organisme d'une part et les macrophages de ce même organisme de l'autre.

Les quelques résultats fournis jusqu'ici dans cet ordre d'idées, par la méthode expérimentale, n'ont fait que rendre plus évident ce rôle des macrophages; lors de ses expériences entreprises dans le but d'étudier le sort de la toxine tétanique injectée dans l'organisme, Metchnikoff¹ vit les cellules nerveuses, introduites dans le péritoine des cobayes, englobées par les macrophages et digérées à leur intérieur. La découverte des cytolysines est venue donner à cette question un nouvel intérêt.

En cherchant à se rendre compte du lieu de l'organisme où s'opère la destruction des spermatozoïdes et des hématies injectées dans le péritoine des cobayes, M. Metchnikoff² vit ces éléments détruits exclusivement à l'intérieur des leucocytes, plus particulièrement, des mononucléaires, qui les englobent vivants et les digèrent. Il put se convaincre qu'il n'existe pas dans ce cas de dissolution extracellulaire des produits injectés, et que des diverses parties de la cellule, c'est le noyau qui résiste le plus longtemps à l'action des diastases digestives. Les macrophages bourrés d'inclusions cellulaires rentrent au bout de quelque temps dans les ganglions mésentériques et dans la rate; on les trouve accumulés en grand nombre, surtout dans le premier de ces organes.

La découverte d'un sérum hépatolytique, obtenu à la suite d'injections répétées de cellules du foie d'un animal à une espèce différente, m'a engagé à entreprendre des recherches dans le but d'élucider le mécanisme suivant lequel les cellules hépatiques sont résorbées dans l'organisme. Tillmanns³, dans un travail, publié en 1879, sur la cicatrisation des plaies du foie, avait déjà observé que des fragments de tissu hépatique introduits dans le péritoine d'un animal étaient rapidement entourés, envahis et pénétrés par des leucocytes; il considérait ces derniers comme les éléments formateurs du tissu fibreux que l'on voit souvent s'organiser autour des fragments injectés.

1. E. METCHNIKOFF, *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, t. XII, p. 263.

2. E. METCHNIKOFF, *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, t. XIII, p. 737.

3. TILLMANN, *Virchows Archiv.*, 1879, t. LXXVIII, p. 437.

M. Delezenne¹, en injectant des émulsions de foie de chien à des canards; M. Deutsch², en injectant à des lapins du foie de cobaye, sont arrivés, indépendamment l'un de l'autre, à obtenir un sérum spécifiquement toxique pour la cellule hépatique dont il détermine rapidement, *in vivo*, la dégénérescence graisseuse ou la nécrose. M. Delezenne a vu cette action spécifique s'accompagner de phénomènes d'insuffisance hépatique tels que la diminution, dans l'urine, de la proportion d'urée, l'augmentation parallèle des sels ammoniacaux, l'excrétion de quantités notables de leucine et de tyrosine, et, enfin, dans certains cas, l'apparition du sucre.

Moi-même³ j'avais signalé, à la même époque, le fait que les cellules hépatiques, injectées dans le péritoine, sont détruites à l'intérieur de macrophages isolés ou réunis en cellules géantes, que cette résorption est souvent très lente et n'est parfois pas achevée au bout de 10 semaines.

C'est l'étude détaillée des phénomènes qui accompagnent la résorption expérimentale de la cellule hépatique que je vais présenter ici. J'ai étudié cette résorption dans deux cas : 1° dans celui où l'espèce qui a fourni le foie et celle qui a reçu l'injection sont très voisines l'une de l'autre dans la série animale : tels sont le lapin et le cobaye; 2° dans celui où les deux espèces appartiennent à des groupes très éloignés; c'est ainsi que j'ai observé le mode de destruction du foie de grenouille, injecté dans le péritoine des cobayes ou dans les veines des lapins. J'ajouterai que tandis que les cobayes supportent assez facilement l'injection du foie de lapin, lapins et cobayes sont au contraire très sensibles à l'injection du foie de grenouille. Cette injection s'accompagne souvent de phénomènes toxiques graves, tels que anémie rapide et cachexie aboutissant à la mort au bout de 1-3 semaines. Il faut donc, lorsque l'on veut renouveler les injections, procéder avec une extrême prudence, n'injecter au début que de très faibles doses (1/2 foie de grenouille à la fois pour commencer) et préparer 24 heures à l'avance l'animal au moyen d'injections intrapéritonéales et intraveineuses faites avec

1. DELEZENNE, Sérum antihépatique. *C. R. du Congrès international de médecine*, Paris, 6 août 1900. DELEZENNE, *C. R. Acad. Sciences*, 11 août 1900.

2. L. DEUTSCH, *C. R. du Congrès internat. de médecine*, 4 août 1900.

3. J. CANTACUZÈNE, *C. R. du Congrès internat. de médecine*, Sect. de bactériologie, p. 56.

la solution physiologique de NaCl, suivant que l'on veut injecter le foie dans le péritoine ou dans les veines. En prenant ces précautions, on arrive à vacciner les animaux et à obtenir un sérum spécifique fortement toxique. D'ailleurs, j'insisterai surtout dans cette étude, sur la description des phénomènes qui accompagnent l'injection du foie à des animaux neufs.

L'étude des coupes a été faite sur des pièces fixées avec la solution saturée acide de bichlorure de mercure. J'ai employé, après bien des essais, le liquide colorant suivant, qui m'a permis de bien suivre les diverses transformations de la cellule hépatique au sein des macrophages :

Sol. a)	Eosine aqueuse.....	0 gr. 25 centigrammes.
	Alcool à 40°.....	100 grammes
Sol. b)	Solution saturée de methyl-orange dans l'alcool absolu.	

On mélange les solutions *a* et *b* en parties égales. Les coupes sont laissées en contact pendant 5 minutes avec ce mélange acide ; on décolore à fond avec l'alcool absolu, puis on colore pendant 10 minutes avec l'hématoxyline de Delafield. Les hématies se colorent alors en jaune-vert pâle ; le protoplasma des cellules hépatiques injectées est coloré en rose assez vif à l'extérieur des macrophages et pendant les premières heures qui suivent leur englobement ; il prend une coloration de plus en plus orangée, à mesure que progresse la digestion intracellulaire ; finalement, et lorsqu'il est sur le point de se dissoudre dans l'intérieur des vacuoles digestives, sa coloration est d'un orange très franc.

II

L'injection d'une émulsion de foie dans le péritoine du cobaye, qu'il s'agisse de foie de lapin ou de foie de grenouille, donne lieu à une série de phénomènes macroscopiques sensiblement analogues dans les deux cas. Dès les premières heures qui suivent l'injection, les fragments de foie se fixent et s'accumulent sur l'épiploon, le mésentère, surtout les mésentères gastro-splénique et gastro-hépatique ; ces surfaces prennent un aspect rouillé quand il s'agit du foie de lapin, noir dans le cas de la grenouille (le foie de cet animal étant très riche en pigment noir brun que le broiement de l'organe met en liberté dans l'émulsion). A mesure que le liquide péritonéal, brun au début, s'éclaircit, le dépôt épiploïque s'épaissit et se fonce davantage ;

en même temps il se concentre sur certains points de l'épiploon et disparaît graduellement sur d'autres, si bien que 4 jours environ après l'injection, l'exsudat péritonéal est entièrement clair; les surfaces mésentériques et épiploïques apparaissent nettes et brillantes sur presque toute leur étendue; au contraire, un épais dépôt de foie s'est accumulé, sous forme de bourrelet, le long du bord inférieur de l'épiploon, au niveau de la portion glandulaire de l'organe; çà et là, dans les replis de l'épiploon et du mésentère, on trouve également des grumeaux hépatiques dont la taille peut atteindre le volume d'un gros pois: mais ces grumeaux sont bien délimités, adhérents au substratum; le dépôt diffus a disparu. De petits amas, beaucoup plus rares, existent également à la face inférieure du diaphragme et en divers points de la paroi.

Ces grumeaux diminuent progressivement de volume et se résorbent. Nous avons déjà vu le dépôt diffus disparaître au bout de 3-4 jours; au bout de 10 jours les plus petits amas, ceux dont le volume ne dépasse pas celui d'une épingle, ont disparu également. Au bout de 2 mois il ne reste plus que des fragments fixés au bord glandulaire de l'épiploon, mais très réduits, très fragmentés et fortement adhérents au substratum. Il m'est arrivé d'en trouver encore au bout de 3 mois: ils sont alors à peine perceptibles à l'œil nu. Jamais je n'en ai observé au delà de 4 mois après l'injection: donc, à ce moment, la résorption du foie injecté dans le péritoine est complète.

La résorption graduelle du foie introduit dans l'organisme par la voie veineuse est impossible à suivre à l'œil nu: cette injection donne lieu à une hyperhémie intense du foie et de la rate; ce dernier organe en particulier double et triple parfois de volume; à la coupe le sang s'en échappe à flots. Dans le cas d'injections intraveineuses répétées, sa surface devient bosselée et montre de petits tubercules durs et l'organe tout entier prend une consistance fibreuse. De nombreux foyers de pneumonie lobulaire parsèment les poumons pendant les premiers jours qui suivent l'injection intraveineuse; des ecchymoses: sous-pleurales et sous-capsulaires apparaissent dans les poumons et les reins. Ces divers phénomènes congestifs et échymotiques sont particulièrement intenses dans le cas où l'on injecte du foie de grenouille.

Très peu de temps après l'injection du foie dans le péritoine, on constate l'engorgement des lymphatiques de la paroi abdominale ainsi que de ceux qui se rendent aux ganglions mésentériques; 3-8 jours après l'inoculation, les ganglions mésentériques prennent une teinte d'un brun violet qui disparaît graduellement au bout de quelques semaines. La rate, dans le cas où le foie injecté appartient à la grenouille, acquiert au bout d'une semaine une coloration franchement brune. Nous verrons plus loin que ces changements de coloration sont en rapport avec la rentrée, dans la rate et les ganglions, de nombreux macrophages chargés de pigment hépatique qu'ils ont englobé dans la cavité péritonéale. Il y a donc ici transport en divers points de l'organisme des produits absorbés dans le péritoine, phénomène qui n'existe pas lorsque l'on fait dans cette sérieuse des injections de carmin, ainsi que l'a démontré Ricoux¹ dans sa thèse inaugurale.

Presque toujours quelques adhérences fibreuses finissent par réunir entre eux les replis de l'épiploon où se trouvent logés les grumeaux de foie. Il s'agit là, ainsi que nous le verrons plus loin, d'un développement de tissu conjonctif de nouvelle formation, qui s'organise autour de la masse hépatique, au sein de la coque fibreuse qui entoure cette dernière. Cette réaction fibreuse est d'autant plus énergique que l'animal est mieux vacciné; elle est particulièrement intense dans les cas où on injecte du foie de grenouille. Souvent, dans ce dernier cas, et surtout lorsqu'il s'agit de grumeaux volumineux, la masse hépatique se trouve, vers le 3^e mois, logé dans une épaisse coque fibreuse, alors que son centre n'est pas encore complètement résorbé.

L'injection de l'émulsion du foie donne lieu à un certain nombre d'effets toxiques s'accompagnant de lésions cellulaires du sang, du rein, du foie, du poumon, de la rate et d'autres organes; ces lésions sont beaucoup plus profondes avec le foie de grenouille qu'avec celui de cobaye ou de lapin, et surtout lorsque l'injection a lieu dans les veines.

Sang. — L'injection de foie est toujours suivie d'un court stade d'hypoleucocytose, extrêmement marqué lorsque l'inject-

1. RICOUX, *Contribution à l'étude du problème de l'inflammation*, thèse de Paris, 1898.

tion se fait dans les veines. A ce moment, en effet, il se produit une accumulation énorme de polynucléaires dans les petits vaisseaux du poumon, dans les sinus de la rate, dans les capillaires du foie.

Vers la 6^e heure apparaît une hyperleucocytose considérable, le nombre des polynucléaires atteignant à ce moment 75 ou 80 0/0 du nombre total des leucocytes en circulation. Au bout de 24 heures, on constate invariablement une destruction très énergique de globules rouges dans les sinus de la rate et des ganglions lymphatiques, ainsi que dans les capillaires du foie, destruction qui s'opère toujours au sein des macrophages. Ces derniers, particulièrement dans la rate, sont tellement bourrés d'hématies que l'organe présente souvent à ce moment l'aspect microscopique d'une rate malarique. Les globules ainsi détruits appartiennent bien à l'espèce animale ayant subi l'injection et non pas à l'espèce ayant fourni le foie, ainsi qu'il est facile de s'en rendre compte lors des injections faites avec du foie de grenouille. Dans les cas de cachexie toxique survenant après des injections répétées, on voit apparaître en grand nombre dans le sang des hématies nucléées. Ces cas coïncident avec une abondante formation de globules rouges nucléés dans la rate.

Rate. — Les modifications de la rate sont extrêmement intéressantes à observer dans les cas de cachexie toxique; on y voit apparaître, en effet, avec une abondance variable, tous les éléments cellulaires caractéristiques de la moelle osseuse. Cette transformation myéloïde de la rate, que d'ailleurs je n'ai jamais vue totale, est faible après une seule injection de foie, très énergique, au contraire, chez les individus en cours de vaccination.

Voici les éléments anormaux que l'on trouve constamment et en grande abondance chez ces derniers : *a*) de grands éléments à noyau bourgeonnant (megacaryocytes) distribués par très petits groupes et relativement rares; *b*) des éléments éosinophiles en très grand nombre : les uns mononucléaires, à protoplasma assez peu développé, d'autres plus volumineux avec noyau en boudin, d'autres enfin à noyau identique à celui des polynucléaires du sang. Les granulations éosinophiles sont très petites et appartiennent au groupe des pseudo-éosinophiles de Ehrlich; *c*) des éléments à protoplasma fortement baso-

phile et bourrés souvent de très petites granulations se colorant en violet par la thionine; ils sont mono ou polynucléaires; d) de nombreuses cellules mères des hématies, à protoplasma acidophile, à noyau très compact, se colorant en violet noir homogène par la thionine. Tous ces éléments nouveaux venus apparaissent dans les sinus de la pulpe; je ne les ai que très rarement observés dans les glomérules. Cette transformation myéloïde est précédée et accompagnée d'un très grand nombre de karyokinèses des petits éléments de la pulpe : ce fait conduit à penser que la transformation a lieu sur place et qu'il ne s'agit pas là, tout au moins d'une façon exclusive, d'éléments issus de la moelle osseuse et immigrés dans la rate. La moelle osseuse ne présente d'ailleurs, au cours de ces injections, aucune modification appréciable.

La transformation myéloïde de la rate est donc un fait facile à constater chez les animaux-traités par les injections répétées de foie; pour ce qui est de la description morphologique de ces éléments et de leur mode de groupement, je n'ai pu que confirmer les faits établis par Dominici¹ dans ses savants mémoires.

Dans les cas d'injections uniques, cette transformation est nulle ou à peine marquée; elle est en tout cas incomplète et l'on ne rencontre alors que certains des types cellulaires énumérés plus haut; ce sont les megacaryocytes qui m'ont semblé apparaître les premiers; puis viennent les myélocytes éosinophiles. La transformation paraît s'arrêter à ce stade.

Chez les animaux ayant subi des injections intraveineuses multiples, on constate dans la pulpe des îlots nombreux de tissu fibreux qui présentent, dans une gangue fibreuse, des cellules géantes encore bourrées de pigment hépatique, nés de la confluence des gigantophagocytes pulpaire et rattachés par de nombreuses brides conjonctives du tissu fibreux environnant.

Rein. — Les injections intraveineuses de foie de cobaye ne déterminent que des phénomènes de légère irritation passagère. L'hyperhémie capillaire est faible; la plupart des cellules des tubuli ont leur protoplasma creusé d'une énorme vacuole refoulant le noyau contre la paroi et témoignant d'une suractivité sécrétoire. Au bout de 24 heures tout est terminé; quelques

1. DOMINICI, *Arch. méd. expér.*, novembre 1900, p. 744, et janvier 1901, p. 1.

lambeaux de protoplasma sont tombés dans la lumière du tube. Il n'y a pas d'infiltration leucocytaire.

Les injections de foie de grenouille donnent lieu, au contraire, à de sérieux phénomènes de néphrite aiguë : 48 heures après l'injection, on observe souvent une altération profonde des cellules des tubuli ; certains tubes sont complètement dépouillés de leur épithélium : protoplasme et noyaux forment un magma réuni au centre de la lumière ; ailleurs l'épithélium adhère encore par lambeaux, ou bien on constate un gonflement énorme des cellules épithéliales.

Les espaces lymphatiques intertubulaires sont infiltrés de nombreux mononucléaires à noyau fortement chromatique ; bon nombre de ces éléments ont pénétré dans l'intérieur des tubes contournés. Les tubes collecteurs contiennent de gros cylindres urinaires, mais leurs cellules propres sont en bon état. Les capillaires sont partout gorgés de sang. Ces formes de néphrite aiguë sont d'ailleurs suivies de la mort rapide de l'animal.

Foie. — La cellule hépatique ne semble pas souffrir de l'injection de foie de cobaye. Le seul phénomène appréciable est l'apparition dans le protoplasme cellulaire, 24-36 heures après l'injection, de grains ovoïdes se colorant en jaune orange par le méthyl-orange, en vert par la thionine ; leurs réactions colorantes sont sensiblement les mêmes que celles des hématies digérées dans l'intérieur des macrophages. Il s'agit là évidemment d'un produit d'élaboration de la cellule hépatique ; il est aisé de se rendre compte que ces grains apparaissent sous forme de petits microsomes qui se multiplient par division : on les trouve en effet le plus souvent accolés deux par deux et souvent rattachés l'un à l'autre par un pont transversal (formes en haltères).

Les injections de foie de grenouille sont au contraire toxiques pour la cellule hépatique ; bon nombre de ces éléments, en effet, bien que l'aspect de leur protoplasma paraisse normal, sont entourés de leucocytes mononucléaires à gros noyau qui fréquemment pénètrent dans l'intérieur même de la cellule attaquée.

Poumon. — 24-48 heures après l'injection intraveineuse de foie, on trouve dans le poumon des lésions de pneumonie lobulaire disséminées en foyers. A ce niveau les alvéoles contiennent de nombreuses hématies au milieu desquelles pénètrent des macrophages qui les englobent en masse.

L'épithélium alvéolaire n'est que rarement altéré. Des phénomènes analogues s'observent au milieu des bronches lobulaires. D'ailleurs ce processus pneumonique s'éteint rapidement et sans laisser de traces; les exsudats se résorbent et au bout de 10 jours l'aspect microscopique du poumon est normal.

III

Telles sont les principales lésions anatomo-pathologiques dues à l'action des poisons hépatiques. Nous allons maintenant étudier le sort des cellules hépatiques elles-mêmes injectées dans le péritoine ou dans les veines.

Résorption des cellules hépatiques en suspension dans l'exsudat péritonéal. — Jusque vers la fin du 3^e jour après l'injection, on trouve dans l'exsudat des cellules hépatiques libres, en nombre, il est vrai, de moins en moins grand. Ces éléments, dont le protoplasme est plus ou moins déchiqueté, présentent un noyau intact et vivant. Si, en effet, nous faisons avec l'exsudat de 48 heures une goutte suspendue à laquelle nous ajoutons une trace de solution aqueuse de bleu de méthylène, nous y observerons une masse de gros leucocytes mononucléaires gorgés de débris de cellules hépatiques; les noyaux de ces dernières s'y colorent en violet pâle; les noyaux des cellules libres ne prennent au contraire aucune coloration. En outre, et dans le cas d'injections de foie de lapin seulement, ces mêmes macrophages contiennent en abondance de gros microsomes colorés en vert pâle par le bleu. Ces microsomes ne s'observent pas dans les cellules hépatiques libres, ou du moins ils n'y présentent pas les mêmes réactions colorantes; il s'agit donc là de certaines portions du protoplasme hépatique ayant subi de la part des macrophages une élaboration spéciale.

Dès les premières heures qui suivent l'injection, le péritoine est envahi par une masse énorme de leucocytes; polynucléaires et gros mononucléaires s'y trouvent en nombre à peu près égal.

Les polynucléaires aussi bien que les macrophages englobent aussitôt des fragments de cellules hépatiques. Les polynucléaires se gorgent d'une substance granuleuse, empruntée à la cellule hépatique, qui refoule le noyau et se colore bientôt, au sein du

protoplasma leucocytaire, en vert par la thionine. Ce métachromatisme est absolument caractéristique. Au bout de 24 heures la masse intracellulaire devient acidophile, se colore en rose vif par l'éosine, tandis qu'une foule de fines granulations éosinophiles apparaissent tout autour dans le protoplasma du leucocyte. Jamais ces polynucléaires n'englobent de noyaux hépatiques.

Les mononucléaires englobent également dès le début des portions de cellules hépatiques, non plus sous forme d'un amas granuleux et mal délimité, mais bien sous forme de fragments protoplasmiques à bords nets et très fréquemment munis de leur noyau. Ces fragments se trouvent inclus dans de grandes vacuoles où la thionine les colore en vert; ils y deviennent de moins en moins distincts, mais sans jamais subir la transformation éosinophile. Quant aux microsomes dont nous avons parlé plus haut, ils ne se rencontrent pas dans les polynucléaires. Dans les mononucléaires, ils s'accumulent de préférence autour du noyau. Il est difficile d'affirmer si ces microsomes sont l'homologue du pigment hépatique noir si abondant dans le foie de la grenouille. Lorsque l'on injecte du foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye, on trouve d'abord ces grains de pigment librement suspendus dans l'exsudat péritonéal qui à ce moment rappelle une solution d'encre de Chine. Les polynucléaires et les mononucléaires englobent des quantités considérables de ce pigment, mais les mononucléaires s'en gorgent avec une voracité toute particulière. Le macrophage apparaît alors comme une tache d'un noir d'encre; il faut souvent quelque peine pour retrouver le noyau refoulé à la périphérie, et noyé au milieu de ce pigment hépatique. La présence de ce pigment à l'intérieur des macrophages les signale immédiatement à notre attention, et nous permet de les suivre ensuite dans toutes leurs migrations à travers la séreuse péritonéale et jusque dans l'intérieur des organes lymphoïdes. Ce pigment est digéré au sein de petites vacuoles bien délimitées. La digestion est d'autant plus rapide que l'animal est mieux vacciné.

Au bout de 3 jours, l'exsudat péritonéal ne contient plus ni cellules hépatiques ni pigment libre; on y rencontre encore quelques macrophages contenant des débris de cellules ainsi que des polynucléaires englobés. L'exsudat est clair au bout de 4 jours; on y trouve à partir de ce moment une foule de gros

lymphocytes (ou petits mononucléaires), à noyau très chromatique, à protoplasma franchement basophile, et dont nous aurons l'occasion de parler plus loin à propos de la néo-formation du tissu fibreux.

Quand on injecte dans le péritoine des cobayes non plus du foie de lapin, mais du foie de cobaye, on observe que la mononucléose l'emporte cette fois dès le début de beaucoup sur la polynucléose; on rencontre en général un polynucléaire pour 5 mononucléaires. De plus, les polynucléaires présents ne phagocytent pas; leur protoplasma reste clair. Les macrophages englobent au contraire rapidement les cellules hépatiques injectées et les digèrent dans de grandes vacuoles. Jamais, néanmoins, ces fragments ingérés ne présentent, après coloration par la thionine, le métachromatisme vert signalé plus haut.

Tandis qu'un certain nombre de cellules injectées se détruisent ainsi dans l'exsudat à l'intérieur des phagocytes, le phénomène principal se passe à la surface de l'épiploon et s'y continue alors que l'exsudat péritonéal est déjà clarifié. C'est là que, par la méthode des coupes, nous allons pouvoir l'étudier dans tous ses détails.

IV

RÉSORPTION DES GRUMEUX HÉPATIQUES ACCOLÉS AU BORD INFÉRIEUR DE L'ÉPIPLOON

a) Étude d'un grumeau hépatique 24 heures après l'injection. — Étudions, par la méthode des coupes, un grumeau de taille moyenne, par exemple, du volume d'un grain de blé, 24 heures après l'injection du foie de lapin ou de grenouille dans le péritoine d'un cobaye. A un examen d'ensemble, nous voyons ceci : au centre se trouve une masse de cellules hépatiques, bien reconnaissables, accolées les unes aux autres, tout en conservant leur individualité; leurs noyaux se colorent bien, seulement la chromatine, au lieu de se présenter comme dans le foie en place sous forme de 1 ou 2 gros grains centraux, avec couronne périphérique de très petits grains, est ici réduite en une sorte de poussière de grains chromatiques diffusés dans la masse entière du noyau. Cette zone centrale, qui représente environ le $1/5$ de l'épaisseur totale du noyau, n'est pas infiltrée

de leucocytes. Ça et là un noyau leucocytaire, appartenant exclusivement à des leucocytes polynucléaires.

Autour de cette zone centrale se trouve une bande, brusquement délimitée vers le centre, moins bien définie vers la périphérie, où nous voyons la masse hépatique infiltrée d'un nombre colossal de leucocytes ; les polynucléaires prédominent dans la portion centrale ; du côté périphérique, les gros mononucléaires apparaissent presque exclusivement. A ce niveau, les noyaux de cellules hépatiques ne se colorent plus que rarement ; dans ce cas même, la chromatine a disparu et le noyau apparaît comme une pâle tache lilas. Vers la périphérie de cette zone d'infiltration, beaucoup de noyaux se colorent en rose par l'éosine. Cette zone moyenne occupe de chaque côté $\frac{1}{5}$ environ de l'épaisseur totale du grumeau.

A la périphérie du grumeau, nous trouvons une zone où l'infiltration leucocytaire est, à première vue, moins abondante ; on y voit moins de noyaux de leucocytes : c'est qu'ici, en effet, les polynucléaires manquent presque totalement. Le tissu hépatique, vu à un faible grossissement, y apparaît comme divisé en segments irréguliers de forme et de dimensions, mais nettement séparés les uns des autres. A ces segments sont accolés des noyaux de mononucléaires ; on a là un tableau qui rappelle l'aspect des *Körnchen Kugeln*. Les noyaux des cellules hépatiques ne sont plus visibles en général ; là où on les trouve encore, ils apparaissent comme une tache ovoïde et nettement éosinophile. Cette bande périphérique se creuse de lacunes nombreuses remplies de leucocytes mononucléaires.

L'amas tout entier est entouré d'une coque fibrineuse peu épaisse qui l'isole de l'épiploon. On y trouve quelques leucocytes polynucléaires et un nombre un peu plus considérable d'éléments mononucléaires, à noyau volumineux et très chromophile, à protoplasma basophile. Nous verrons plus loin le rôle de ces éléments.

L'endothélium péritonéal est en bon état. Immédiatement sous l'endothélium, il y a une accumulation considérable de leucocytes mononucléaires, grands et petits, le protoplasma vide d'inclusions et sortant des fentes lymphatiques sous-endothéliales. Partout ils traversent l'endothélium et pénètrent dans la coque fibrineuse qui entoure le grumeau.

Nulle part, dans le tissu conjonctif sous-endothélial, je n'ai pu trouver de karyokinèses. Il est hors de doute que ces éléments mobiles ne sont pas nés sur place, mais viennent de plus loin, en suivant la voie lymphatique. Ils sont identiques, morphologiquement, avec les leucocytes mononucléaires à gros noyau vésiculeux, de la pulpe splénique ou des lacunes ganglionnaires. D'ailleurs, sur des coupes de rate du même animal, on voit la capsule infiltrée en tous sens par une foule d'éléments semblables, qui pénètrent directement dans la cavité péritonéale à travers l'endothélium splénique. J'ajoute que cet endothélium est fortement turgescant; il fait une saillie prononcée dans la cavité, mais il semble demeurer en place.

Analysons de plus près ces divers tableaux microscopiques. Nous voyons donc que notre grumeau présente : une zone centrale non attaquée où les cellules hépatiques sont intactes; une zone moyenne, abondamment infiltrée de leucocytes avec prédominance des polynucléaires dans la portion centrale; une zone périphérique où le magma hépatique est complètement disloqué, on n'y trouve que des leucocytes mononucléaires.

La zone périphérique est entièrement infiltrée et disloquée par des mononucléaires et des mononucléaires seulement. Les uns s'étalent à la surface du grumeau; d'autres s'insinuent comme des coins dans les interstices cellulaires : ceux-là sont très allongés, le noyau occupant l'extrémité postérieure, leur direction générale est radiaire par rapport à la coupe du grumeau. Chemin faisant, même lorsqu'ils ne contiennent aucun fragment de protoplasma hépatique, ils se chargent de grains vert bleu, qui permettent de délimiter exactement leur masse protoplasmique; un grand nombre, très étirés, pénètrent dans l'intérieur des cellules hépatiques et les disloquent; d'autres enfin, et ce sont les plus nombreux à ce niveau, s'étalent à la surface des fragments hépatiques disloqués et les englobent complètement. Dans ce cas le noyau est refoulé à la périphérie; les microsomes verts sont accumulés entre le noyau et le fragment hépatique employé; quant à ce dernier, il remplit la presque totalité du phagocyte. Ce sont les fragments hépatiques enfermés dans les macrophages qui donnent au grumeau l'aspect segmenté qui nous avait frappé tout d'abord. Dans cette zone périphérique on ne trouve plus de cellules de foie libres;

toutes sont englobées. Les noyaux hépatiques sont invisibles, ou se colorent en rose par l'éosine : ils semblent donc subir l'action des ferments digestifs plus rapidement que le protoplasma lui-même.

Souvent, et surtout dans la zone la plus externe, on trouve des cellules géantes formées par la confluence des macrophages. Tous les noyaux sont rejetés vers la périphérie et de ce côté les cellules sont encore distinctes les unes des autres ; au contraire, les extrémités des corps allongés dans le sens de la progression se confondent si bien que la cellule géante affecte la forme d'un éventail. La digestion intracellulaire semble plus avancée à l'intérieur de ces plasmodes ; les fragments de cellules hépatiques y sont enfermés dans de grandes vacuoles ; quelques-uns sont presque dissous, ne prennent plus que faiblement la couleur acide. Les microsomes verts y sont constamment situés autour du noyau leucocytaire.

Si, de là, nous nous reportons vers une région plus centrale du grumeau, là où les polynucléaires ont pénétré en grand nombre, nous voyons que de ces polynucléaires les uns encombrant les lacunes interstitielles du magma hépatique ; leur protoplasme y est bourré de cette substance granuleuse déjà observée dans l'exsudat ; ces inclusions sont enfermées dans des vacuoles et y ont une réaction franchement éosinophile. Un très grand nombre de polynucléaires ont pénétré dans l'intérieur des cellules hépatiques ; là, les noyaux leucocytaires prennent les formes les plus étranges : les uns s'épanouissent en bouquets de filaments, chaque filament se terminant par un gros bouton chromatique, offrant ainsi l'aspect d'une gerbe en éventail ; d'autres affectent la forme de grappes allongées dont les éléments s'insèrent le long d'un filament central. On y retrouve toutes les formes décrites et figurées par Guarnieri¹ dans son mémoire sur la pustule vaccinale, et que Salmon² a considérées, à juste titre, comme des leucocytes immigrés. Il est hors de doute, après cela, que les polynucléaires se chargent de certains éléments du protoplasma hépatique. Jamais ils ne contiennent de noyaux hépatiques ou de grains verts.

Un grand nombre de ces polynucléaires dégénèrent dans

1. GUARNIERI, *Archive per le scienze mediche*, 1892.

2. SALMON, *Annales Inst. Pasteur*, 1897, t. XI, p. 288.

les lacunes interstitielles de cette région. Leur noyau est souvent en chromatolyse, réduit en une infinité de petits grains chromatiques; souvent aussi le noyau présente cet aspect vacuolaire propre aux polynucléaires des exsudats tuberculeux. Ils semblent tués par quelque substance toxique qu'ils absorbent avec le protoplasma hépatique.

Cette zone moyenne est également infiltrée de mononucléaires; un grand nombre contiennent des fragments hépatiques; bon nombre de cellules hépatiques sont, néanmoins, encore libres. Un très grand nombre de macrophages y avalent des polynucléaires chargés de débris.

La description précédente s'applique à la résorption du foie de lapin injecté dans le péritoine des cobayes. Les phénomènes qui accompagnent la résorption du foie de grenouille sont sensiblement les mêmes. Ici seulement le pigment noir accumulé dans les macrophages est infiniment plus abondant; de plus, les polynucléaires de la région centrale du grumeau contiennent, eux aussi, du pigment noir, bien que en quantité beaucoup moins grande que les leucocytes mononucléaires.

Comment expliquer cette polynucléose abondante du centre de l'amas alors que les polynucléaires font défaut dans la portion périphérique? Il est vraisemblable que dès les premiers moments de l'accumulation des cellules hépatiques sur l'épiploon, les polynucléaires à ce moment présents dans la cavité péritonéale y ont pénétré en grand nombre. Puis, de nouveaux polynucléaires ne pénétrant plus dans la cavité (sans doute en vertu du faible pouvoir chimiotactique du foie sur ces éléments) et de nouvelles couches de cellules hépatiques venant s'agglomérer au-dessus des couches primitives, l'infiltration leucocytaire n'a plus été due qu'aux seuls mononucléaires sortant en grand nombre des organes lymphoïdes.

A cette période, sur une coupe de la rate, on trouve un nombre assez considérable de mononucléaires chargés de pigment noir dans la portion sous-capsulaire de la pulpe; on n'en trouve guère dans les grands sinus sanguins. Ce fait semble indiquer que la rentrée de ces éléments dans la rate s'effectue en passant directement de la cavité péritonéale à travers l'endothélium splénique. Ces éléments se retrouvent également, mais beaucoup plus rarement, dans les ganglions mésentéri-

ques; enfin, les cellules de Kupfer du foie ne contiennent aucune trace de pigment.

Tels sont les phénomènes que l'on observe dans la masse des grumeaux hépatiques.

Au niveau de la coque fibrineuse qui entoure le grumeau, on peut déjà observer la formation de quelques fibres conjonctives. Le mécanisme en est intéressant à signaler.

Ces jeunes fibres conjonctives sont courtes, épaisses, très ondulées. Elles se présentent sous l'aspect de longs boudins flexueux montrant une portion axiale qui occupe presque toute l'épaisseur de la fibre, ne se colorant pas par l'éosine, brillante, fendillée dans le sens de la longueur de façon à figurer un écheveau compact. Cette portion centrale est enveloppée d'un mince manchon, se colorant en rose par l'éosine, présentant des épaississements au niveau des noyaux de la fibre. Ce manchon lui-même montre une fine structure fibrillaire. Sur cette gaine sont appliqués les noyaux, très allongés, de la jeune fibre conjonctive, les uns volumineux, pâles, riches en suc nucléaire; les autres d'une extrême petitesse, très minces, et fortement chromatiques.

Ces fibres se forment de la façon suivante : la coque fibrineuse est abordée de l'extérieur, par des éléments mononucléaires, à noyau volumineux, présentant au centre un ou deux gros grains de chromatine et un réseau de chromatine périphérique. Leur protoplasma, assez volumineux, est homogène et basophile. En somme, ces éléments rappellent les formes jeunes des mononucléaires macrophages. Ils s'étalent à la surface du filament de fibrine; leur noyau s'y applique intimement. Leur protoplasma s'étale de plus en plus, engainant ainsi un filament de fibrine qu'il encapuchonne aux deux extrémités; souvent plusieurs cellules s'étalent à la surface du même filament autour duquel ils forment un plasmodium allongé; le filament de fibrine se trouve de la sorte rapidement inclus dans ce plasmodium ou dans cette cellule unique, et isolé du reste du réseau fibrineux.

Au sein de ce plasmodium la portion centrale de la fibrine perd rapidement son affinité pour l'éosine; elle reste incolore, se fendille dans le sens de la longueur, constituant ainsi un écheveau de fibrilles. Il s'agit là évidemment d'une élaboration

de la fibrine due aux ferments digestifs du plasmodium. La gaine périphérique conserve sa colorabilité et représente pour ainsi dire l'exoplasme cellulaire. Ses noyaux étalés à la surface perdent rapidement leur caractère primitif; ils semblent grossir d'abord, se gorger de suc nucléaire, puis ils s'allongent, diminuent, « maigrissent » et, dans la fibre constituée, ont acquis un volume très petit par perte du suc nucléaire.

La fibre toute entière s'allonge, s'amincit, s'étrangle même de place en place. Tel est le mode d'apparition des jeunes fibres conjonctives dans les cas observés par moi; la substance fibrillaire est le résultat d'une élaboration protoplasmique nettement en rapport avec le pouvoir phagocytaire. Quant à l'origine des éléments qui ont servi à la formation de la fibre, il n'est pas douteux pour moi qu'il ne s'agisse là de leucocytes et de stades jeunes de macrophages. Ce sont des éléments migrants et, de plus, des phagocytes; à ce point de vue mes observations sont complètement d'accord avec celles de F. Marchand¹; mais tandis que ce savant considère ces « fibroblastes » comme des cellules du tissu conjonctif mobilisées, en s'appuyant sur le nombre considérable de karyokinèses qui s'observaient à ce moment dans le tissu conjonctif de la région, je crois pouvoir affirmer que, du moins dans le cas présent, ces éléments ont une origine tout autre. En effet, non seulement je n'ai observé à ce moment aucune karyokinèse dans le tissu conjonctif de l'épiploon, mais j'ai vu ces mêmes éléments se montrer en grand nombre dans les espaces lymphatiques sous-endothéliaux, mélangés aux macrophages en diapédèse. De plus, ils sont identiques aux formes jeunes de ces mêmes macrophages que l'on observe dans la pulpe de rate. D'ailleurs, nous verrons plus loin que les macrophages adultes, même associés en cellules géantes, peuvent devenir à un moment donné cellules fixes du tissu conjonctif;

b) *Étude d'un grumeau hépatique 3 jours après l'injection intrapéritonéale.* — Ici nous trouvons la portion centrale du grumeau complètement infiltrée et disloquée par les mononucléaires. On y trouve encore, néanmoins, bon nombre de cellules hépatiques non englobées dont les noyaux se colorent faiblement par les couleurs basiques. Dans les grumeaux de foie de grenouille, les

1. F. MARCHAND, *Der Process der Wundheilung*, Stuttgart, 1901, p. 116.

noyaux de la région centrale ne prennent plus la couleur. Ils sont visiblement atteints de nécrose.

La zone moyenne, à polynucléaires, est entièrement envahie par les mononucléaires; la masse hépatique y présente cet aspect segmenté que nous avons observé, dans le cas précédent, à la partie périphérique du grumeau. C'est qu'ici, en effet, presque toutes les cellules du foie se trouvent enfermées à l'intérieur des macrophages qui, en bien des endroits, se fusionnent et forment des cellules géantes bourrées de débris hépatiques. On ne trouve plus guère, dans les grumeaux de foie de lapin, de polynucléaires libres. Presque tous sont enfermés à l'intérieur des macrophages. Cette destruction des polynucléaires peut s'observer dans tous ses détails à l'intérieur de vastes lacunes qui, maintenant, existent en grand nombre dans la région moyenne du grumeau. Cette même destruction des polynucléaires est beaucoup moins avancée dans le foie de grenouille; on y trouve encore un nombre considérable de ces microphages libres, le noyau refoulé à la périphérie, et contenant dans des vacuoles de larges fragments de protoplasma hépatique.

En somme, comme on le voit, la destruction de l'amas hépatique par les macrophages est beaucoup plus avancée que dans le cas précédent.

La région la plus intéressante à considérer dans le cas qui nous occupe est la zone périphérique du grumeau. Elle est entièrement occupée par de grandes cellules géantes à l'intérieur desquelles la digestion des fragments hépatiques est très avancée et souvent presque terminée. Ces plasmodia commencent par avoir leurs noyaux situés à la périphérie, les fragments de protoplasma hépatique enfermés dans de grandes vacuoles, occupant le centre de la formation. Autour du noyau sont accumulés les microsomes verts signalés plus haut. Ce sont les fragments de foie les plus voisins du noyau qui sont digérés les premiers; on peut suivre facilement leur dissolution à l'intérieur des vacuoles; ils prennent les couleurs acides avec de moins en moins d'énergie; finalement la vacuole reste pleine d'un liquide incolore. A mesure que s'opère cette dissolution, les noyaux tendent à avancer de plus en plus vers le centre du plasmodium et à se mettre en contact avec des portions de protoplasma hépatique dont la digestion est moins avancée; si bien

que, là où la digestion intracellulaire est presque complète, les noyaux tendent à se réunir au centre de la cellule géante dont la périphérie est maintenant occupée entièrement par d'immenses vacuoles claires, séparées les unes des autres par de minces brides protoplasmiques. Le groupe central de noyaux entraîne, en se déplaçant, les grains de pigment vert disposés autour d'eux.

Les mêmes phénomènes s'observent dans les macrophages isolés, non fusionnés en plasmodia : le noyau avance à l'intérieur de la cellule à mesure que se poursuit la digestion intracellulaire du foie ; il se trouve ainsi transporté bientôt d'une extrémité à l'autre de l'élément, sa position primitive étant maintenant occupée par les grandes vacuoles qui contiennent les résidus de la digestion intracellulaire.

Cette portion vacuolaire de la cellule géante ne tarde pas à se détruire ; les bords du plasmodium s'effacent, se confondent avec le milieu ambiant : on voit se former autour de la cellule comme une atmosphère nuageuse, parsemée de fins granules légèrement colorée en rose par l'éosine. Le plasmodium « fond » par sa périphérie, il entre en phagolyse. La conséquence de ce fait est que les produits élaborés à leur intérieur sont mis en liberté dans le milieu ambiant. Ce phénomène que j'ai observé aussi bien dans la rate, après les injections intraveineuses de foie, que dans les grumeaux, fixés sur l'épiploon jusqu'au moment de leur complète résorption, me semble être absolument constant. Il est donc possible que tel est le mécanisme suivant lequel la substance sensibilisatrice est sécrétée dans les humeurs de l'animal.

Parmi ces macrophages en phagolyse, un grand nombre ont perdu, par suite de leur fonte, presque tout leur protoplasma ; ils restent réduits au noyau, entouré de grains de pigment, et à une masse protoplasmique relativement faible. C'est sous cette forme qu'on les voit rentrer en masse dans la circulation lymphatique et dans les organes lymphoïdes ; les lymphatiques sous-endothéliaux du péritoine, la pulpe splénique, surtout la région sous-capsulaire, sont remplis à ce moment de macrophages bourrés de pigment hépatique. On en trouve également en notable quantité à l'intérieur des lacunes des ganglions mésentériques.

Au contraire, ces éléments ne semblent pas rentrer dans la moelle osseuse qui paraît ne prendre aucune part à ces phénomènes de résorption.

Un grumeau de taille moyenne met de la sorte 10 jours à 4 mois pour se détruire complètement. Le mécanisme est toujours le même que celui étudié jusqu'ici. Les mononucléaires gagnent de plus en plus le centre de l'amas. Toutes les cellules hépatiques sont successivement englobées, digérées à l'intérieur de ces éléments; ceux de la périphérie subissent la fonte phagolytique, puis rentrent dans la circulation lymphatique. C'est ainsi que vers le 15^e jour on voit souvent des grumeaux réduits à 1 ou 2 cellules géantes.

La production de fibres conjonctives jeunes est peu abondante; tout se réduit à la formation de quelques fibres qui, développées, comme nous l'avons vu, dans la coque fibrineuse, établissent quelques adhérences entre les replis épiploïques où se trouvait logé le grumeau hépatique. Nous allons voir que cette néo-formation fibreuse est beaucoup plus énergique chez les animaux qui ont déjà subi plusieurs injections antérieures de foie, et tout particulièrement lorsque le foie injecté est celui de grenouille.

Avant de terminer ce paragraphe, disons quelques mots de la résorption du foie de cobaye injecté dans le péritoine du cobaye même. Cette résorption est plus rapide que dans le cas où l'animal qui fournit le foie et celui qui subit l'injection appartiennent à des espèces différentes. Un grumeau de faibles dimensions est, 24 heures après l'injection, complètement infiltré jusqu'en son centre. Les polynucléaires ne prennent ici aucune part à l'attaque des cellules hépatiques; les mononucléaires seuls sont attirés. Jamais, en outre, on n'assiste aux phénomènes de fonte cellulaire et de phagolyse que nous avons observés plus haut;

c) Résorption du foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye ayant subi des injections répétées. — Étude d'un grumeau de 5 jours. — Le fait le plus remarquable dans ce cas, c'est l'énergie de la réaction fibreuse et la participation des cellules géantes, bourrées de fragments hépatiques, à la constitution du tissu fibreux.

La coupe d'un semblable grumeau nous montre : au centre, une masse peu volumineuse de cellules hépatiques non infiltrées,

ayant subi un commencement de nécrose, les noyaux étant devenus complètement invisibles.

Autour de cette masse centrale, une couronne *unique* de cellules géantes, disloquant l'amas hépatique, bourrées de fragments à divers stades de digestion intracellulaire, parsemées à la périphérie de grandes vacuoles et subissant déjà à ce niveau la fonte phagolytique. La portion périphérique de ces cellules géantes envoie dans tous les sens de longs prolongements dans lesquels le protoplasma présente un aspect fibrillaire. Ces prolongements se ramifient, s'anastomosent entre eux, entourant ainsi la cellule géante d'un réseau de mailles assez larges. Le long de ces mailles s'étalent de nombreux éléments migrants à gros noyaux chromatiques, à protoplasma basophile, en tout semblables aux cellules que nous avons vues, plus haut, contribuer à la formation de la fibre conjonctive. Ces « fibroblastes » s'allongent, s'étirent en longs filaments qui s'accolent aux prolongements des cellules géantes.

En dehors de cette zone on trouve un amas de fibroblastes analogues, mais très étirés, émettant de toutes parts des prolongements qui s'anastomosent entre eux, constituant ainsi un tissu conjonctif à mailles très lâches, à corps cellulaires très volumineux et à noyaux présentant encore tous les caractères de ceux des leucocytes mononucléaires. Ça et là, au milieu du réseau, se voient de grandes cellules géantes, à couronne périphérique de noyaux, bourrées de pigment hépatique, mais ne contenant généralement plus de fragments cellulaires. Elles émettent, de toutes parts, des prolongements ramifiés, qui s'anastomosent avec le tissu conjonctif qui les entoure. Plus on approche de la périphérie du grumeau, plus on voit les fibroblastes s'allonger, prendre une structure fibrillaire et rubannée; de plus, ils s'orientent parallèlement les uns aux autres et concentriquement par rapport au centre de l'amas.

Au milieu de cette gangue fibreuse sont plongés de nombreux macrophages isolés ou réunis en cellules géantes, et rattachés au tissu fibreux par de nombreux prolongements ramifiés. Sa masse fibreuse se continue directement avec le réseau conjonctif de l'épiploon dont l'endothélium a disparu en ce point.

Il est évident que l'amas conjonctif tout entier à une double origine, étant constitué par une masse de fibroblastes anastomosés

entre eux d'une part, et de l'autre par de nombreuses cellules géantes, témoins d'un processus phagocytaire déjà terminé et devenues cellules fixes de ce tissu conjonctif de nouvelle formation.

Quelle est maintenant l'origine de ces fibroblastes ou plutôt de ces petits mononucléaires à noyau chromatique? Dans tout le tissu conjonctif environnant, on ne voit *aucune karyokinèse*; par contre, les vaisseaux lymphatiques de l'épiploon, et cela surtout en certains points déterminés, sont remplis de mononucléaires analogues à ceux qui donnent les fibroblastes. On les voit se diriger, par traînées, vers l'amas fibreux, traverser celui-ci et confluer en masse vers la couronne de cellules géantes en train de dévorer le reliquat hépatique. Le sens de la progression de ces cellules est nettement indiqué par le sens de leur allongement.

Sans pouvoir affirmer que le tissu conjonctif préexistant ne joue aucun rôle dans la constitution du tissu conjonctif jeune, je me suis convaincu néanmoins que tout au moins la plus grande partie de ce tissu nouveau se forme par la fixation de leucocytes mononucléaires jeunes, issus, par migration, de l'appareil lymphatique. Quant à la fixation des cellules géantes qui ont achevé leur rôle phagocytaire, elle ne peut être mise en doute un instant.

On trouve dans l'épiploon de nombreux macrophages chargés de pigment qui de toutes parts pénètrent dans les fentes lymphatiques. En certains points du rebord glandulaire de l'épiploon, ils sont accumulés au point d'y simuler de véritables amas ganglionnaires.

Bon nombre de cellules fixes du tissu conjonctif mésentérique sont bourrées de pigment noir, sans qu'il soit possible de dire s'il s'agit là de macrophages fixés nouvellement ou de cellules fixes ayant joué un rôle phagocytaire.

Toute la pulpe de la rate ainsi que les lacunes des ganglions mésentériques contiennent un grand nombre de ces macrophages chargés de granulations hépatiques.

Signalons encore ce fait, en terminant, que chez les animaux ayant subi des injections répétées, les polynucléaires ne jouent aucun rôle dans la destruction du foie injecté.

V

RÉSORPTION DES CELLULES HÉPATIQUES INTRODUITES DANS L'ORGANISME
PAR VOIE INTRAVEINEUSE

Le foie de cobaye ou de grenouille que l'on injecte à un lapin par voie intraveineuse subit une destruction plus rapide que celui introduit dans l'organisme par voie intrapéritonéale.

Dans la rate, qui est le lieu principal de destruction du foie, je n'ai guère retrouvé de fragments appréciables de protoplasma hépatique plus d'une semaine après l'injection. Par contre, la destruction des polynucléaires, très énergique dès le début dans la pulpe de rate, se continue souvent pendant 15 jours ou 3 semaines.

Les trois barrières d'arrêt du foie injecté sont, au début, le poumon, le foie, la rate. Le rôle du poumon est vite terminé; au bout de 36 heures on n'y trouve plus de fragments hépatiques. Celui du foie dure plus longtemps; mais c'est dans la rate, à l'intérieur des sinus sanguins, que s'opère la presque totalité de la destruction. Quant aux ganglions mésentériques, leur rôle est tardif et, en somme, peu important; ce n'est que vers le 3^e jour que l'on voit apparaître quelques macrophages chargés de granulations hépatiques.

Poumon. — 4 heures après l'injection intraveineuse on trouve des fragments hépatiques, avec noyaux bien conservés, arrêtés dans les vaisseaux de petit calibre. Ces fragments sont infiltrés de leucocytes polynucléaires qui contiennent déjà des débris de protoplasma hépatique. On n'y voit pas de mononucléaires.

Au bout de 12 heures, ces mêmes amas sont entourés, pénétrés en tous sens par les mononucléaires qui ont déjà réduit le fragment tout entier à l'état de *Körnchenkugeln*. Ces macrophages, en même temps que les cellules du foie, englobent les polynucléaires qui y ont pénétré. Ces mononucléaires remplissent les vaisseaux lymphatiques et pénètrent dans les vaisseaux par diapédèse à travers l'endothélium. Celui-ci reste en place, intact.

Au bout de 24 heures, on ne trouve plus que de rares macrophages gorgés de fragments hépatiques. Il est évident que la majorité d'entre eux, entraînés par le courant sanguin, a dû venir échouer dans la rate ou le foie, car l'on n'en retrouve pas ailleurs.

Foie. — Dès 4 heures après l'injection, les cellules de Kupfer démesurément gonflées et étalées sont remplies de petits fragments hépatiques se colorant en rose par l'éosine. Quand l'injection a été faite avec du foie de grenouille, elles sont tellement bourrées de pigment noir que l'on a souvent une peine infinie à trouver le noyau. Ce pigment hépatique, qui semble se détruire plus lentement que le protoplasma hépatique lui-même, se retrouve encore dans les cellules de Kupfer au bout de 10 jours, mais beaucoup moins abondant et moins foncé.

Rate. — C'est ici le foyer principal pour la destruction des cellules hépatiques. Quatre heures après l'injection intraveineuse, les sinus sont encombrés de fragments déchiquetés où l'on retrouve les noyaux des cellules hépatiques. A leur intérieur pénétrant des polynucléaires en nombre très grand; une masse énorme de macrophages contiennent déjà presque tous de volumineux fragments hépatiques, bien délimités et se colorant en rose par l'éosine; ailleurs, on voit plusieurs macrophages entourer un même fragment de foie et accoler leurs noyaux à sa surface.

Au bout de 12 heures, la quantité de fragments libres a beaucoup diminué; on n'en voit guère où ne soit accolé un macrophage. Dans le protoplasma de ceux-ci, bon nombre de fragments hépatiques commencent à fixer d'une façon énergique le méthyl-orangé.

Mais le phénomène le plus remarquable, à ce stade, est la destruction en masse des polynucléaires dans l'intérieur des macrophages; ceux-ci en sont souvent bourrés à éclater. Les polynucléaires y dégèrent rapidement; dès maintenant leur rôle semble terminé.

Au bout de 24 heures, on ne trouve plus de fragments hépatiques libres; dans beaucoup de sinus les macrophages forment d'énormes plasmodia, occupant toute la largeur du sinus, avec noyaux périphériques et bourrés de fragments roses ou légèrement orangés enfermés dans de vastes vacuoles. Comme dans le

cas de la résorption intrapéritonéale du foie, on voit ces vacuoles se disposer petit à petit vers la périphérie de la cellule géante, puis se confondre avec le liquide ambiant. Là encore nous assistons à la fonte périphérique du plasmodium.

Au bout d'une semaine, la résorption des cellules paraît terminée et les macrophages, dépourvus de vacuoles, ne contiennent plus guère à ce moment qu'un peu de pigment hépatique.

Chez les lapins qui ont déjà subi un certain nombre d'injections antérieures, cette destruction du foie dans les sinus de la rate est infiniment plus rapide ; 24 heures après l'injection les sinus tranchent sur le reste de la pulpe par leur coloration d'un orangé vif. Il est facile de s'assurer que cet aspect est dû au fait que les macrophages sont démesurément bourrés de protoplasma hépatique, lequel, à leur intérieur, fixe avec intensité le méthyl-orange. En outre, on ne trouve plus à ce moment de fragments extracellulaires libres.

Un autre fait caractéristique est que chez ces mêmes animaux, les polynucléaires semblent ne jouer aucun rôle : ils n'englobent point de fragments hépatiques, et l'on n'observe plus, dans ce cas, leur destruction à l'intérieur des macrophages.

VI

RÉSUMÉ

L'injection du foie d'une espèce animale dans le péritoine d'une espèce différente donne lieu aux phénomènes suivants :

1° Le foie injecté se rassemble en amas sur l'épiploon, principalement sur sa portion glandulaire. Ils s'y résorbent graduellement, le temps nécessaire à cette résorption variant, selon leur taille, de 10 jours à 3 mois. Cette résorption est complète ;

2° Les cellules du foie injecté restent vivantes pendant 3 jours environ. Jusqu'à ce moment leurs noyaux ne se colorent pas en gouttes suspendues. Au contraire, elles sont tuées dès

qu'elles ont été englobées par les macrophages, cet englobement débutant aussitôt après l'injection. Après 3 jours, l'amas hépatique non encore phagocyté est frappé de nécrose de coagulation;

3° Les leucocytes polynucléaires jouent un certain rôle au début de la résorption des cellules hépatiques. Ils se chargent de protoplasma qui subit, à leur intérieur, la transformation éosinophile. Jamais ils n'englobent de noyau. Ils n'englobent que faiblement le pigment hépatique. Très souvent les polynucléaires chargés de débris hépatiques dégèrent après 2 ou 3 jours. En tout cas, *tous*, au bout de 3 jours, sont détruits par les mononucléaires. On ne peut donc leur attribuer aucun rôle dans l'élaboration de l'anticorps;

4° La destruction des cellules hépatiques est exclusivement dévolue aux mononucléaires qui, progressivement, pénètrent jusqu'au centre de l'amas, disloquent les cellules du foie, les englobent et les digèrent dans de grandes vacuoles où le foie acquiert une affinité de plus en plus grande pour le méthylorange, à mesure que la digestion intracellulaire est plus avancée. Cette réaction microchimique est surtout très nette chez les animaux vaccinés. Les mononucléaires seuls avalent et détruisent les noyaux;

5° En même temps qu'ils détruisent le protoplasma hépatique, les mononucléaires se chargent de pigment qui se concentre autour du noyau du macrophage, entre ce noyau et les vacuoles digestives. Cet amas accompagne le noyau dans ses migrations à travers le protoplasma cellulaire : en effet, le noyau tend à se mettre en contact avec les fragments de protoplasma en voie de digestion;

6° Les macrophages en activité se groupent souvent pour former des plasmodia (cellules géantes). Qu'il s'agisse de ces plasmodia ou de phagocytes restés isolés, les vacuoles où s'est achevée la digestion intracellulaire, se disposent à la périphérie de l'élément. Le protoplasma de ce dernier subit la fonte phagolytique et le contenu des vacuoles se trouve ainsi déversé dans les humeurs ambiantes. Il y a là un phénomène tout à fait comparable à la sécrétion des glandes dites « par fonte cellulaire ». Tel est, peut-être, le mécanisme du passage, dans les humeurs, de la substance sensibilisatrice. Le même phénomène

s'observe dans la rate, lorsque l'on introduit le foie par voie veineuse ;

7° Les macrophages chargés de granulations hépatiques rentrent dans l'appareil lymphatique, soit qu'ils cheminent à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques aboutissant à l'épiploon, soit qu'ils rentrent directement dans la rate et les ganglions mésentériques en passant directement à travers l'endothélium péritonéal. Les deux voies sont également suivies ;

8° Ni dans l'exsudat ni à la surface de l'épiploon, on ne peut observer de digestion extracellulaire des cellules hépatiques. Dans les amas volumineux, dont le centre n'est atteint que tardivement par l'infiltration des mononucléaires, le magma hépatique demeure intact et compact pendant plus de 2 mois jusqu'au moment où intervient l'action phagocytaire ;

9° La résorption de l'amas est d'autant plus rapide que l'animal qui a subi l'injection est plus voisin de l'espèce qui a fourni le foie. La résorption la plus rapide s'effectue lorsque l'on injecte à un cobaye le foie d'un autre cobaye ; ce même animal résorbe plus lentement le foie de lapin. C'est le foie de grenouille qui est le plus long à disparaître. La résorption chez les animaux ayant subi des injections répétées, s'accomplit incomparablement plus vite que chez les animaux neufs.

10° Autour des amas de foie se développent des fibres conjonctives jeunes. Cette réaction fibreuse, très peu intense chez les animaux neufs, est très énergique chez les vaccinés. Chez les neufs, elle s'effectue grâce à de petits leucocytes mononucléaires (fibroblastes) qui s'étalent à la surface des filaments de fibrine qu'ils englobent. Les fibrilles conjonctives résultent d'une élaboration interne du protoplasma, suite d'un acte de digestion intracellulaire. Chez les animaux déjà inoculés antérieurement, le tissu fibreux se constitue par un afflux énorme de fibroblastes qui entourent les cellules géantes chargées de pigment, celles-ci s'unissent à eux au moyen de fins prolongements protoplasmiques. Beaucoup de cellules géantes se fixent de la sorte et deviennent partie intégrante du tissu fibreux nouvellement formé.

Ces fibroblastes sont des leucocytes mononucléaires (cellules épithélioïdes) issus des vaisseaux lymphatiques et ne proviennent pas du tissu conjonctif préexistant. A ce niveau je n'ai guère observé de karyokinèses ;

L'injection du foie dans les veines donne lieu aux phénomènes suivants :

11° Une partie du foie est arrêtée dès le début dans les vaisseaux sanguins du poumon. Les grumeaux hépatiques, d'abord pénétrés de polynucléaires, sont rapidement disloqués et englobés par les mononucléaires qui au bout de 24-36 heures les charrient dans les organes lymphoïdes.

Les cellules de Kupfer du foie arrêtent, également dès le début, une portion des cellules hépatiques injectées. La destruction graduelle du protoplasma et du pigment hépatique s'y effectue en 8 ou 10 jours;

12° Le lieu principal de la destruction des cellules hépatiques introduites par voie sanguine, se trouve dans les sinus sanguins de la rate. On y observe la même série de faits que sur l'épiploon; seulement ici la résorption totale est plus rapide et ne semble guère dépasser une semaine. Elle est encore bien plus rapide chez les vaccinés. Le rôle destructeur est dévolu ici aux gigantophagocytes de la pulpe. Ils digèrent le foie dans de grandes vacuoles, en s'associant sous forme de vastes plasmodia. Vers la fin du processus ces cellules géantes subissent une phagolyse partielle. Dès les premières heures qui suivent l'injection, il s'opère dans les macrophages une destruction intense de polynucléaires. Il est, dès lors, hors de doute que les leucocytes mononucléaires issus des organes lymphoïdes sont les agents exclusifs de la résorption des cellules hépatiques.

Les ganglions mésentériques semblent jouer, dans cette résorption, un rôle moins actif que la rate, du moins lorsque le foie est injecté par voie veineuse. La moelle osseuse semble rester absolument inactive.

13° Les injections de foie déterminent un certain nombre de lésions toxiques sur les cellules de l'organisme, tels que des phénomènes de néphrite portant exclusivement sur les cellules des tubuli. La modification la plus intéressante entraînée par ces injections est la transformation myéloïde (non totale) de la rate, telle qu'elle a été observée et décrite par Dominici.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE VIII

FIG. 1. — Injection de foie de lapin dans le péritoine du cobaye. Exsudat péritonéal 24 heures après l'injection. Transformation éosinophile de la substance hépatique englobée par les polynucléaires.

FIG. 2. — Injection de foie de lapin dans le péritoine d'un cobaye. Coupe d'un grumeau hépatique 24 heures après l'injection. Zone moyenne. Les macrophages s'insinuent entre les cellules hépatiques. Pénétration des polynucléaires dans le protoplasma hépatique.

FIG. 3. — *Idem*. Zone périphérique. Englobement de fragments hépatiques par les macrophages chargés de grains de pigment.

FIG. 4. — Injection de foie de cobaye à un cobaye. Portion d'une coupe d'un grumeau hépatique de 24 heures. Zone périphérique, complètement disloquée. Cellules hépatiques incluses dans les macrophages.

FIG. 5. — Injection de foie de lapin dans le péritoine d'un cobaye, coupe d'un grumeau de 3 jours. Lacune interstitielle; on y voit des polynucléaires chargés de débris, en karyolyse; des macrophages digérant des fragments de foie, des polynucléaires, du pigment hépatique.

PLANCHE IX

FIG. 6. — *Idem*. Zone périphérique. Plasmodium de macrophages contenant des fragments de foie. En bien des points, la digestion intracellulaire est achevée; les vacuoles sont claires; elles commencent à se disposer à la périphérie du plasmodium.

FIG. 7. — Injection de foie de grenouille dans le péritoine d'un cobaye ayant subi plusieurs injections antérieures. Coupe d'un grumeau de cinq jours. Cellule géante attaquant la masse hépatique. Elle contient des fragments hépatiques. A la périphérie, formation de vacuoles. Le plasmodium émet par sa périphérie des prolongements qui commencent à se fixer à ceux des fibroblastes immigrés.

FIG. 8. — Injection de foie de grenouille dans les veines d'un lapin. Coupe

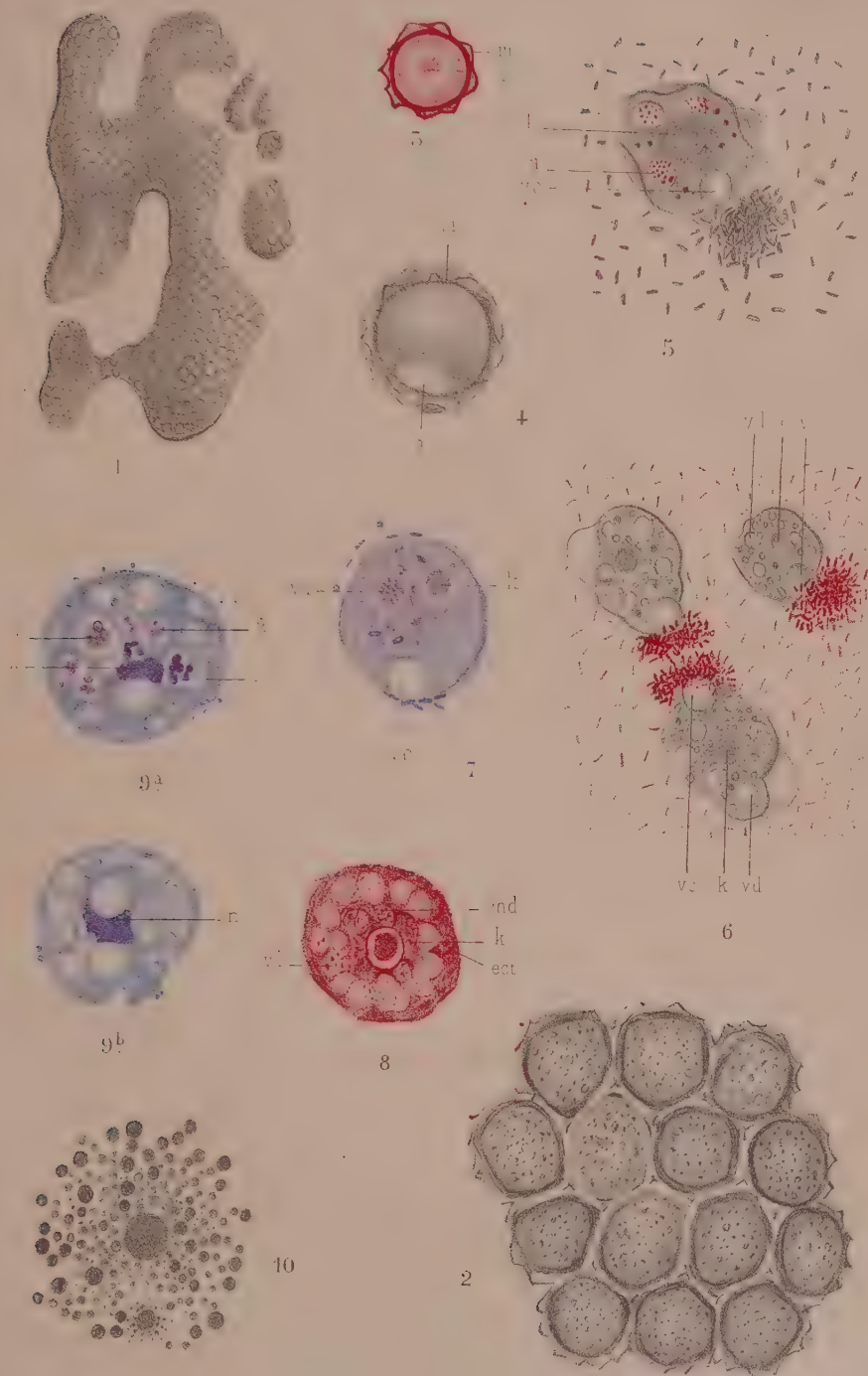
du foie 4 heures après l'injection. Les cellules de Kupfer sont chargées de pigment hépatique.

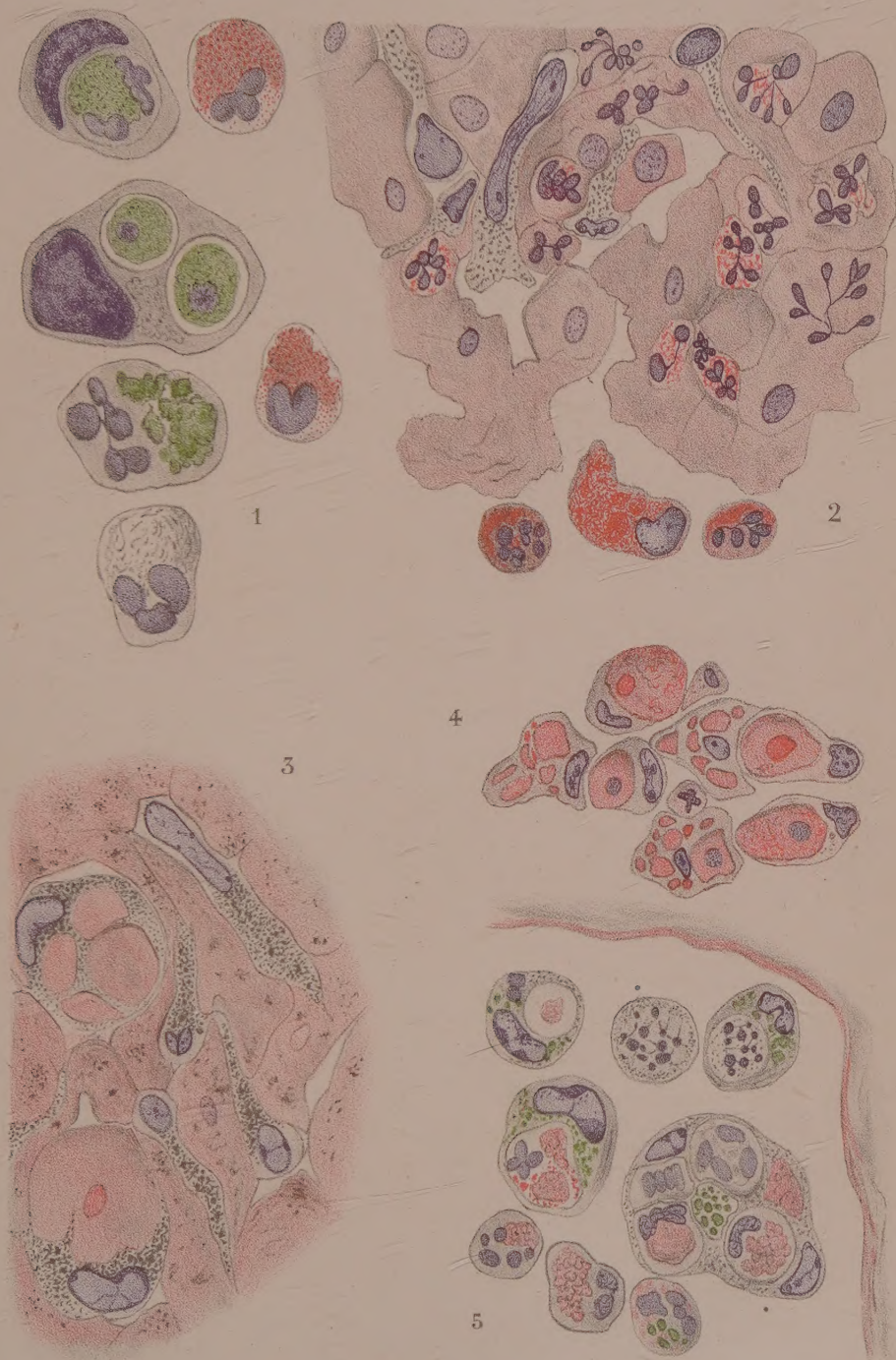
FIG. 9. — Injection de foie de cobaye dans les veines d'un lapin. Coupe de la rate 24 heures après l'injection. Dans un sinus, on voit les fragments de foie entourés et partiellement englobés par les macrophages. Abondante destruction de polynucléaires dans l'intérieur des macrophages.

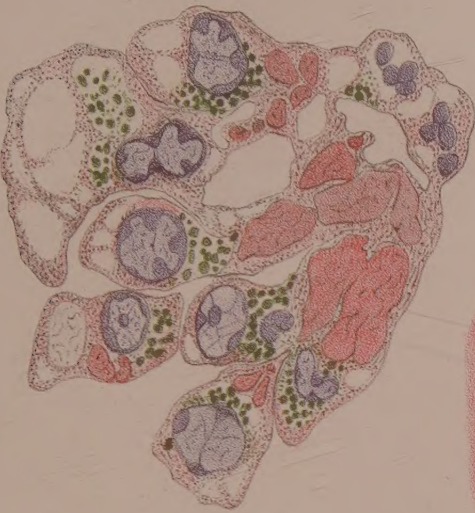
Le cours et les manipulations du service d'analyse et de chimie appliquée à l'hygiène (3^e année), commenceront en novembre.

Ce cours s'adresse spécialement aux pharmaciens, médecins et chimistes industriels.

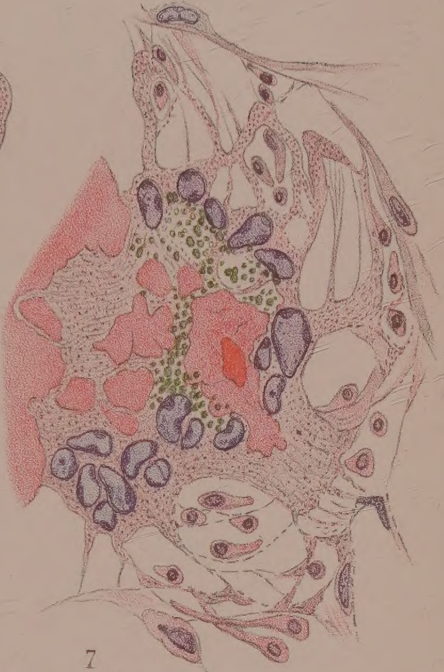
S'adresser pour renseignements à l'Institut Pasteur, 26, rue Dutot.



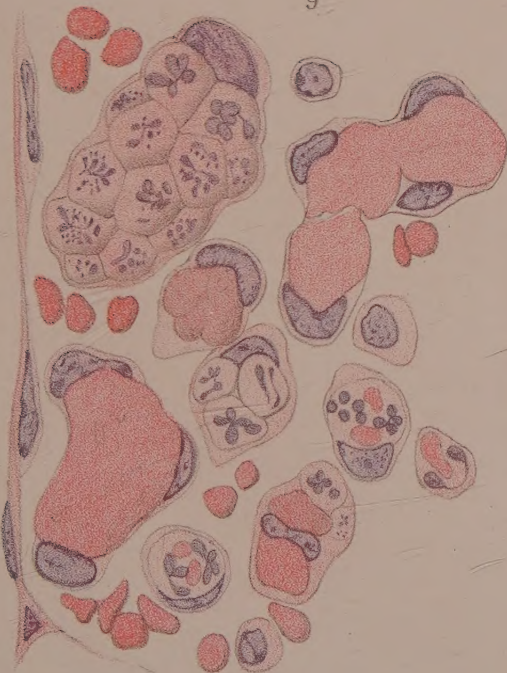




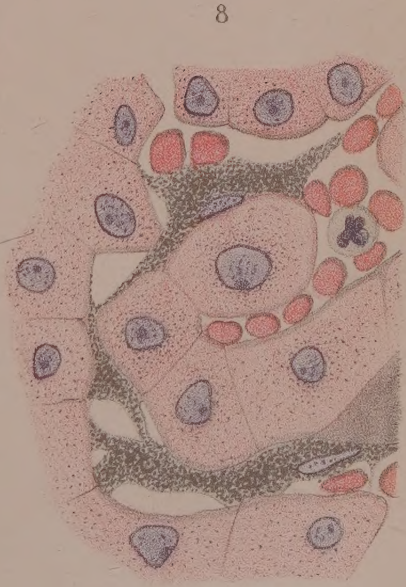
6



7



9



8

D^r J. Cantacuzène, del.

V. Roussel, lith.

